

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
16 mai 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 02/38178 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
A61K 39/395, 38/17, 31/7088, G01N  
33/53, A61P 35/00 // C07K 14/47, 16/18

(74) Mandataires : CATHERINE, Alain etc.; Cabinet  
HARLE et PHELIP, 7 rue de Madrid, F-75008 PARIS  
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/03475

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,  
ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international :  
8 novembre 2001 (08.11.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
00 14422 9 novembre 2000 (09.11.2000) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : IN-  
STITUT PASTEUR DE LILLE [FR/FR]; 1 rue du Pro-  
fesseur Calmette, F-59019 LILLE cedex (FR). INSTITUT  
NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE  
MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac,  
F-75654 Paris Cedex (FR).

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : LAS-  
SALLE, Philippe [FR/FR]; Résidence Sébastopol,  
Appartement 14, 13 rue Colbrant, F-59000 LILLE (FR).  
BECHARD, David [FR/FR]; 30 rue des Martyrs, F-75009  
PARIS (FR). TONNEL, André-Bernard [FR/FR]; rue  
Gabriel Péri, F-59840 PREMESQUES (FR).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.*

(54) Title: USE OF A COMPOUND ANTAGONIST OF THE ESM-1 PROTEIN FOR PRODUCING A MEDICINE FOR TREAT-  
ING CANCER

(54) Titre : UTILISATION D'UN COMPOSE ANTAGONISTE DE LA PROTEINE ESM-1 POUR LA FABRICATION D'UN  
MEDICAMENT POUR LE TRAITEMENT D'UN CANCER

(57) Abstract: The invention concerns the use of a compound antagonist of the ESM-1 protein for making a medicine for treating  
cancer.

(57) Abrégé : Utilisation d'un composé antagoniste de la protéine ESM-1 pour la fabrication d'un médicament pour le traitement  
d'un cancer.

WO 02/38178 A1

UTILISATION D'UN COMPOSE ANTAGONISTE DE LA PROTEINE ESM-1 POUR LA FABRICATION  
D'UN MEDICAMENT POUR LE TRAITEMENT D'UN CANCER

5

**Domaine de l'invention**

La présente invention se rapporte au domaine de la prévention  
10 et/ou du traitement des cancers.

**Etat de la technique**

En dépit des énormes investissements économiques et  
15 humains, le cancer reste l'une des causes majeures de décès.

Le cancer est fréquemment une maladie liée à des déficits dans  
le système de signalisation intracellulaire. Les cellules normales  
répondent à de nombreux signaux extracellulaires en proliférant, en se  
différenciant ou plus généralement en altérant leur activité métabolique.  
20 De tels signaux sont reçus à la surface des cellules et convertis par un  
système de protéines de transduction du signal en un message reconnu  
par la cellule. Ce message est responsable de phénomènes de  
régulation cellulaire ultérieure.

La métastase est la formation d'une colonie tumorale  
25 secondaire à un site distant de la tumeur initiale. Il s'agit d'un processus  
multi-étapes pour lequel l'invasion tumorale est un événement précoce.  
Les cellules tumorales s'échappent localement à travers des barrières  
tissulaires, telles que la membrane basale de l'épithélium, et atteignent le  
stroma interstitiel, à partir duquel elles accèdent aux vaisseaux sanguins  
30 ou aux canaux lymphatiques avant dissémination ultérieure. Après avoir  
envahi la couche endothéliale de la paroi vasculaire, les cellules  
tumorales circulantes sont entraînées dans la circulation sanguine et  
sont stoppées dans les veinules précapillaires de l'organe cible par  
adhérence aux surfaces du lumen de la cellule endothéliale, ou sont  
35 exposées aux membranes basales. Les cellules tumorales sortent de la  
paroi vasculaire et entrent dans le parenchyme de l'organe. Enfin, la

cellule tumorale, après extravasation, se multiplie dans un tissu différent de celui dont elle est originaire.

Il est démontré qu'un certain nombre de cancers sont provoqués par des défauts associés à des gènes responsables de la transduction du signal. De tels gènes sont appelés oncogènes. Les oncogènes peuvent conduire à une surexpression d'une ou plusieurs protéines de transduction du signal induisant une prolifération cellulaire anormale. Les signaux défectifs peuvent être liés à des mécanismes divers.

Certaines thérapies anticancéreuses visent à inhiber l'expression ou la biodisponibilité de protéines oncogènes responsables de la prolifération des cellules cancéreuses, telles que les protéines de la famille des MAP kinases ou des produits de certains oncogènes tels que c-myc.

La protéine ESM-1 est un polypeptide de 184 acides aminés sécrétée par les cellules endothéliales et qui a été décrite pour la première fois par LASSALLE et al. (1996). Les ARNs messagers codant pour la protéine ESM-1 sont principalement retrouvés au niveau des cellules endothéliales et des tissus pulmonaires et rénaux. L'expression du gène codant pour ESM-1 est régulée par des cytokines. Le TNF- $\alpha$  et L'IL-1 $\beta$  induisent une augmentation de l'expression du gène ESM-1 dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine, alors que l'Interféron- $\gamma$  diminue son expression.

On a retrouvé une grande quantité de protéine ESM-1 circulante chez des patients présentant un syndrome inflammatoire systémique, tel qu'un choc septique (BECHARD et al., (2000).

Aujourd'hui, le traitement hospitalier du cancer a majoritairement recours à l'utilisation de radiations et/ou d'agents chimiothérapeutiques, tels que la vinblastine ou l'adriamycine. Cependant, les effets indésirables largement reconnus de tels traitements rendent ces stratégies thérapeutiques difficiles à supporter pour le patient.

La présente invention a pour objet de fournir des composés anti-cancéreux qui permettraient de surmonter les inconvénients des

méthodes de traitement thérapeutique du cancer de l'état de la technique.

## SOMMAIRE DE L'INVENTION

5

Un premier objet de l'invention consiste en l'utilisation d'un composé antagoniste de la protéine ESM-1 pour la fabrication d'un médicament pour le traitement d'un cancer.

10

Selon un premier aspect, un composé antagoniste de l'invention est un anticorps se liant spécifiquement à la protéine ESM-1.

Selon un second aspect, un composé antagoniste mis en oeuvre dans le cadre de l'invention est un peptide d'au moins 10 acides aminés de la protéine ESM-1 modifiée et qui comprend l'enchaînement d'acides aminés Ala(134)-Ala(135).

15

Selon un troisième aspect, un composé antagoniste de la protéine ESM-1 consiste en un oligonucléotide antisens hybridant avec l'ADNc codant pour ESM-1.

20

Un autre objet de l'invention consiste en un composé antagoniste de la protéine ESM-1, choisi parmi les composés antagonistes définis ci-dessus.

L'invention est également relative à une composition pharmaceutique destinée au traitement du cancer comprenant un composé antagoniste de la protéine ESM-1.

25

Un autre objet de l'invention consiste en une méthode de prévention d'un cancer comportant une étape au cours de laquelle on administre un composé antagoniste de la protéine ESM-1.

30

L'invention concerne aussi une méthode de traitement thérapeutique du cancer comportant une étape au cours de laquelle on administre à un patient un composé antagoniste de la protéine ESM-1.

## DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

35

Il a été montré pour la première fois selon l'invention que la protéine ESM-1 est sécrétée chez l'homme sous la forme d'un protéoglycane du type chondroïtine/dermatane sulfate et que la protéine

ESM-1 sécrétée est capable de stimuler *in vitro* l'activité mitogène du facteur HGF/SF (pour « Hépatocyte growth factor/scatter factor »).

Le HGF/SF est un facteur important dans l'apparition des dysplasies multicystiques rénales et dans l'apparition d'hyperprolifération des tubules rénaux et a été également associé au développement de  
5 carcinomes du sein, des reins et du poumon mais aussi dans le développement de mélanomes malins.

Il a également été montré selon l'invention que des cellules épithéliales rénales humaines transfectées exprimant la protéine ESM-1  
10 avaient un fort potentiel tumoral et provoquaient l'apparition d'un carcinome rénal *in vivo* chez la souris. Il a également été montré que des anticorps dirigés contre la protéine ESM-1 étaient capables d'inhiber le développement d'une tumeur rénale *in vivo* et qu'un peptide antagoniste de la protéine ESM-1 possédait la même activité anti-tumorale.

De plus, il a été montré selon l'invention une augmentation du  
15 taux sérique de la protéine ESM-1 chez des patients présentant un carcinome broncho-pulmonaire.

En conséquence, un premier objet de l'invention consiste en l'utilisation d'un composé antagoniste de la protéine ESM-1 pour la  
20 fabrication d'un médicament pour la prévention et/ou le traitement d'un cancer.

## DEFINITIONS GENERALES

Les expressions « protéine ESM-1 » ou « polypeptide ESM-1 »,  
25 au sens de l'invention, englobent un polypeptide de 184 acides aminés référencé comme la séquence SEQ ID N°1 du listage de séquences, ainsi qu'un polypeptide de 165 acides aminés identique au polypeptide de séquence SEQ ID N°1 dans lequel les 19 acides aminés de  
30 l'extrémité N-terminale correspondant aux peptides signal sont absents, ce polypeptide de 165 acides aminés constituant la forme sécrétée du polypeptide de séquence SEQ ID N°1. Sont également englobés dans la définition de « protéine ESM-1 » « polypeptide ESM-1 » un glycopeptide respectivement de 184 acides aminés de séquence SEQ ID N°1 et un  
35 polypeptide de 165 acides aminés correspondant à la séquence allant de

l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 184 de la séquence SEQ ID N°1 dont le résidu sérine en position 137 est modifié par O-glycosylation, les formes O-glycosylées de la protéine ESM-1 étant également désignées « glycopeptides » dans la présente description. De  
5 préférence, le glycopeptide ESM-1 possède le résidu sérine en position 137 qui est O-glycosylé par un motif chondroïtine/dermatane sulfate.

Par « composé antagoniste » de la protéine ESM-1, on entend selon l'invention un composé capable de réduire significativement la biodisponibilité de la protéine ESM-1 vis-à-vis de molécules cibles sur  
10 laquelle ou lesquelles la protéine ESM-1 se fixe naturellement. Un composé antagoniste de la protéine ESM-1 peut réduire la biodisponibilité de ces protéines en réduisant la probabilité de liaison de la protéine ESM-1 aux molécules cibles de l'organisme sur lesquelles elle se fixe naturellement. Un composé antagoniste selon l'invention peut  
15 réduire la biodisponibilité de la protéine ESM-1 en inhibant ou bloquant la transcription du gène codant pour ESM-1, en inhibant ou bloquant la traduction de l'ARN messenger correspondant, en altérant la maturation intracellulaire de la protéine ESM-1, par exemple en affectant le processus enzymatique conduisant à sa glycosylation, ou encore en  
20 inhibant ou en bloquant la sécrétion de la protéine ESM-1 mature.

Un premier objet de l'invention consiste en l'utilisation d'un composé antagoniste de la protéine ESM-1 pour la fabrication d'un médicament pour le traitement d'un cancer.

Un composé antagoniste de la protéine ESM-1 peut être de  
25 toute nature, polypeptide, saccharidique, ou encore tout composé organique ou minérale permettant de réduire la biodisponibilité de la protéine ESM-1 vis-à-vis des molécules cibles sur laquelle cette protéine se fixe.

### 30 COMPOSES ANTAGONISTES DE LA PROTEINE ESM-1 DU TYPE ANTICORPS

Une première famille de composés antagonistes de ESM-1 préférée selon l'invention est constituée par des anticorps se liant  
35 spécifiquement à la protéine ESM-1.

Il est montré selon l'invention que des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine ESM-1 sont capables d'inhiber ou de bloquer le pouvoir tumorigène de cette protéine. Des anticorps anti-ESM-1 constituent donc des composés antagonistes d'une grande valeur thérapeutique.

Par « anticorps » au sens de l'invention, on entend notamment des anticorps polyclonaux ou monoclonaux ou des fragments (par exemple les fragments Fab ou F(ab)<sub>2</sub> ou encore tout polypeptide comprenant un domaine de l'anticorps initial reconnaissant la protéine ESM-1.

Des anticorps monoclonaux peuvent être préparés à partir d'hybridome selon la technique décrite par KOHLER et MIELSTEIN (1975).

Il peut s'agir aussi des anticorps dirigés contre ESM-1 ou un fragment de cette protéine produits par la technique du trioma ou encore la technique d'hybridome décrite par KOZBOR et al. (1983).

Il peut s'agir également de fragments d'anticorps simple chaîne Fv (ScFv) tels que ceux décrits dans le brevet US N°4,947,677 ou encore par MARTINEAU et al. (1998).

Des anticorps anti-ESM-1 selon l'invention comprennent également des fragments d'anticorps obtenus à l'aide de banques de phages telles que décrites par RIDDER et al. (1995) ou encore des anticorps humanisés tels que décrits par REINMANN et al. (1997) ou encore par LEGER OJ, et al., 1997.

Il peut s'agir également des anticorps anti-ESM-1 produits selon les techniques décrites par BECHARD et al. (2000). Les anticorps décrits par BECHARD et al. (2000) sont des anticorps monoclonaux sécrétés par des lignées d'hybridome préparées à partir de cellules spléniques de souris préalablement immunisées contre le fragment C-terminal de poids moléculaire de 14 kD de ESM-1 qui a été produit dans *Escherichia coli*, c'est-à-dire un fragment non glycosylé de la protéine ESM-1. Par cartographie d'épitopes, BECHARD et al. (2000) ont pu classer les anticorps monoclonaux produits par les différentes lignées d'hybridome selon la région de la protéine ESM-1 reconnue par ceux-ci.

Une première famille d'anticorps préférée selon l'invention qui constitue des composés antagonistes de la protéine ESM-1 sont les anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement la région allant du résidu proline en position 79 jusqu'au résidu cystéine en position 99 de la séquence SEQ ID N°1, cette région représentant le déterminant antigénique D1. Il s'agit de préférence des anticorps monoclonaux produits par la lignée d'hybridome déposée le 19 Novembre 1997 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'Institut Pasteur (CNCM) sous le n° d'accès N°I-1944, encore appelé anticorps MEP21.

D'autres anticorps monoclonaux préférés sont eux se liant spécifiquement à la partie de la protéine ESM-1 comprise entre le résidu glycine en position 159 et le résidu arginine en position 184 de la séquence SEQ ID N°1 qui est la région constituant le déterminant antigénique D3. Des anticorps monoclonaux préférés spécifiques du déterminant antigénique D3 peuvent être obtenus à partir de la lignée d'hybridome I-1943 (MEP19), déposée le 19 Novembre 1997 auprès de la Collection Nationale de Cultures des Micro-organismes de l'Institut Pasteur (CNCM).

D'autres anticorps monoclonaux préférés selon l'invention sont les anticorps monoclonaux se liant spécifiquement avec la région comprise entre le résidu sérine en position 119 et le résidu valine en position 139 de la protéine ESM-1 de séquence SEQ ID N°1, cette région étant définie comme le déterminant antigénique D2 de la protéine ESM-1. Les anticorps monoclonaux préférés se liant spécifiquement au déterminant antigénique D2 de ESM-1 peuvent être obtenus à partir de la lignée d'hybridome MEP08 déposée le 19 Novembre 1997 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'Institut Pasteur (CNCM) sous le n° d'accès N° I-1941.

D'autres anticorps monoclonaux d'intérêt constituant des composés antagonistes de la protéine ESM-1, au sens de l'invention, sont les anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la partie N-terminale de la protéine ESM-1. Les anticorps monoclonaux préférés dirigés contre la partie N-terminale de la protéine ESM-1 peuvent être obtenus à partir de la lignée d'hybridome MEC15 déposée à la Collection



Nationale de Cultures des Micro-organismes de l'INSTITUT PASTEUR (CNCM) le 17 Octobre 2000 sous le numéro d'accès I-2572.

Selon un aspect tout à fait préféré, les anticorps anti-ESM1 possédant les meilleures activités antagonistes vis-à-vis de ESM-1 sont choisis parmi les anticorps reconnaissant spécifiquement des épitopes localisés dans la région encadrant le résidu phénylalanine en position 115. Il s'agit notamment des anticorps se liant spécifiquement avec la région comprise entre le résidu sérine en position 119 et le résidu valine en position 139 de la protéine ESM-1 de séquence SEQ ID N°1, tel que l'anticorps monoclonal MEP08 décrit ci-dessus.

Il a été montré selon l'invention que l'anticorps monoclonal MEP08 était capable d'inhiber l'activité pro-tumorale de la protéine ESM-1 sur la formation de tumeurs provoquées par la prolifération de cellules humaines d'origine rénale chez la souris.

#### **POLYPEPTIDES ANTAGONISTES DE LA PROTEINE ESM-1**

Il a été montré selon l'invention que la région recouvrant le déterminant antigénique D2 de la protéine ESM-1 était importante pour l'activité pro-tumorale de la protéine ESM-1.

En particulier, le demandeur a synthétisé un polypeptide dérivé de la protéine ESM-1 dans lequel les résidus phénylalanine en positions 134 et 135 de la séquence SEQ ID N°1, c'est-à-dire les résidus en positions 115 et 116 de la protéine ESM-1 sécrétée, ont été remplacés par deux résidus alanine. Le demandeur a montré que ce polypeptide modifié était incapable d'induire des tumeurs chez la souris. Un tel polypeptide modifié peut donc entrer en compétition avec la protéine ESM-1 produite à haut niveau chez des patients cancéreux pour son action potentialisatrice avec des facteurs de croissance comme le HGF/SF ou encore les facteurs de croissance FGF-2 et FGF-7.

Les composés antagonistes de la protéine ESM-1 englobent des polypeptides ayant une longueur d'au moins 10 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID N°1, qui comprennent une séquence d'acides aminés allant de l'acide aminé en position 119 jusqu'à l'acide aminé en position 139 de la séquence SEQ ID N°1, un tel polypeptide

antagoniste de ESM-1 comprenant au moins une substitution d'un acide aminé, par rapport à la séquence correspondante de la protéine ESM-1.

De préférence, un polypeptide antagoniste de la protéine ESM-1 tel que défini ci-dessus possède au plus 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID N°1 et au moins une substitution d'acides aminés, par rapport à la séquence SEQ ID n°1.

Un polypeptide antagoniste de la protéine ESM-1, tel que défini ci-dessus, comprend au plus 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substitutions d'un acide aminé, par rapport à la séquence SEQ ID N°1, le nombre de substitutions d'acides aminés étant adapté en fonction de la longueur du polypeptide, étant entendu que le nombre de substitutions d'acides aminés par rapport à la séquence SEQ ID N°1 dans un polypeptide antagoniste selon l'invention est d'au plus 25% des acides aminés compris dans la séquence de ce polypeptide antagoniste, de préférence au plus 20%, 15% et de manière préférée d'au plus 10% du nombre des acides aminés compris dans la séquence du polypeptide antagoniste de ESM-1.

De manière préférée, une substitution d'acides aminés, par rapport à la séquence SEQ ID N°1, dans un polypeptide antagoniste selon l'invention est une substitution dite « non conservative ». Par substitution « non conservative », on entend la substitution d'un résidu d'acide aminé par un acide aminé d'une classe distincte.

Les acides aminés sont classiquement rangés selon les classes suivantes:

- acides aminés non polaires (hydrophobes): alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phénylalanine, tryptophane et méthionine;
- acides aminés contenant des cycles aromatiques: phénylalanine, tryptophane et tyrosine;
- acides aminés neutres polaires: glycine, sérine, thréonine, cystéine, tyrosine, asparagine et glutamine;
- acides aminés chargés positivement (basiques) : arginine, lysine et histidine);
- acides aminés chargés négativement (acides): acide aspartique et acide glutamique.

Un type de substitution d'acides aminés préféré pour la préparation d'un polypeptide antagoniste de la protéine ESM-1 selon l'invention est la substitution d'un acide aminé contenant un cycle aromatique par un acide aminé ne contenant pas de cycle aromatique.

5 De manière tout à fait préférée, un polypeptide antagoniste de la protéine ESM-1 selon l'invention comprend une substitution des résidus phénylalanines en positions 134 et 135 de la SEQ ID N°1 par deux résidus d'acides aminés, identiques ou différents, ne contenant pas de cycle aromatique.

10 Un tel polypeptide antagoniste de la protéine ESM-1 préféré est un polypeptide d'au moins 10 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID N°1, telle que définie ci-dessus, dans lequel les résidus phénylalanine en positions 134 et 135 ont été remplacés par deux résidus alanine.

15 Selon un premier aspect, un polypeptide antagoniste de la protéine ESM-1 selon l'invention peut être préparé par les techniques classiques de synthèse chimique, indifféremment en solution homogène ou en phase solide.

A titre illustratif, un polypeptide antagoniste de la protéine ESM-1 peut être préparé par la technique en solution homogène décrite par Houben Weil (1974) ou encore la technique de synthèse en phase solide décrite par Merrifield (1965a; 1965b) et Merrifield 1965b.

Un polypeptide antagoniste de la protéine ESM-1 selon l'invention peut être aussi préparé par recombinaison génétique.

25 Pour produire un polypeptide antagoniste de la protéine ESM-1 tel que défini ci-dessus, on peut mettre en oeuvre un procédé comprenant les étapes de:

a) insérer un acide nucléique codant pour le polypeptide antagoniste de la protéine ESM-1 dans un vecteur d'expression approprié;

b) cultiver, dans un milieu de culture approprié, une cellule hôte préalablement transformée ou transfectée avec le vecteur d'expression recombinante de l'étape a);

35 c) récupérer le milieu de culture conditionné ou lyser la cellule hôte, par exemple par sonication ou par choc osmotique;

d) séparer et purifier à partir dudit milieu de culture ou encore à partir des lysats cellulaires obtenus à l'étape c), ledit polypeptide antagoniste;

5 e) le cas échéant, caractériser le polypeptide antagoniste recombinant ainsi produit.

Les polypeptides antagonistes selon l'invention peuvent être caractérisés par fixation sur une colonne de chromatographie d'immunoaffinité sur laquelle les anticorps dirigés contre ce polypeptide ou contre un fragment de ce dernier ont été préalablement immobilisés.

10 Selon un autre aspect, un polypeptide antagoniste de ESM-1 peut-être purifié par passage sur une série appropriée de colonnes de chromatographie, selon les méthodes connues de l'homme de l'art est décrit par exemple dans AUSUBEL F. et al. (1989).

## 15 COMPOSES ANTAGONISTES DE LA PROTEINE ESM-1 DU TYPE OLIGONUCLEOTIDE ANTISENS.

Une autre famille préférée de composés antagonistes de la protéine ESM-1 visant à réduire la biodisponibilité de la protéine ESM-1  
20 sécrétée chez des patients à risque ou chez des patients ayant déjà développé des tumeurs sont des composés capables d'inhiber ou de bloquer l'expression du gène codant pour ESM-1 chez l'homme.

De tels composés antagonistes de la protéine ESM-1 peuvent être des polynucléotides antisens.

25 Les composés antagonistes de la protéine ESM-1 selon l'invention englobent ainsi un polynucléotide antisens capable de s'hybrider spécifiquement à une région déterminée du gène codant pour la protéine ESM-1 et capable d'inhiber ou de bloquer sa transcription et/ou sa traduction.

30 La séquence du gène humain ESM-1 est référencée sous le numéro d'accès AJ401 1091 et AJ401 1092 dans la base de données Genbank.

De préférence, un polynucléotide antisens selon l'invention comprend une séquence complémentaire d'une séquence localisée dans  
35 la région de l'extrémité 5' de l'ADN du gène ESM-1, et de manière tout à

fait préférée la proximité du codon d'initiation de la traduction (ATG) du gène ESM-1.

Selon un second mode de réalisation préférentiel, un polynucléotide antisens selon l'invention comprend une séquence  
5 complémentaire à l'une des séquences localisées au niveau des jonctions exon/intron du gène ESM-1 et de manière préférée des séquences correspondant à un site d'épissage.

Un polynucléotide antisens préféré selon l'invention comprend au moins 15 nucléotides consécutifs de l'ADNc codant pour ESM-1 ayant  
10 la séquence nucléotidique SEQ ID N°2.

Aux fins de la présente invention, un premier polynucléotide est considéré comme étant « complémentaire » d'un second polynucléotide lorsque chaque base du premier nucléotide est appariée à la base  
complémentaire du second polynucléotide dont l'orientation est inversée.  
15 Les bases complémentaires sont A et T (ou A et U), et C et G.

De manière générale, un polynucléotide antisens selon l'invention possède au moins 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000 ou 2000 nucléotides consécutifs de l'ADNc de ESM-1 de séquence SEQ ID N°2.

20 A titre illustratif, un polynucléotide antisens préféré selon l'invention consiste en un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique de l'ADNc de ESM-1 de séquence SEQ ID N°2.

Un polynucléotide antisens constituant un composé antagoniste de la protéine ESM-1 selon l'invention peut être préparé par toute  
25 méthode adaptée bien connue de l'homme du métier, y compris par clonage et action d'enzyme de restriction ou encore par synthèse chimique directe selon des techniques telles que la méthode au phosphodiester de NARANG et al. (1979) ou de BROWN et al. (1979), la méthode au diéthylphosphoramidites de BEAUCAGE et al. (1980) ou  
30 encore la technique sur support solide décrite dans le brevet européen n°EP-0 707 592.

De manière générale, les polynucléotides antisens doivent avoir une longueur et une température de fusion suffisante pour permettre la formation d'un hybride duplex intracellulaire ayant une stabilité suffisante  
35 pour inhiber l'expression de l'ARNm de ESM-1. Des stratégies pour

construire les polynucléotides antisens sont notamment décrites par GREEN et al. (1986) et IZANT et WEINTRAUB (1984).

Des méthodes de construction de polynucléotides antisens sont également décrites par ROSSI et al (1991) ainsi que dans les demandes  
5 PCT N°WO 947/23.026, WO 95/04141, WO 92/L18.522 et dans la demande de brevet européen n°EP 0 572 287.

D'autres méthodes de mise en oeuvre de polynucléotides antisens sont par exemple celles décrites par SCZAKIEL et al. (1995) ou encore celles décrites dans la demande PCT N°WO 95/24.223.

10 L'homme du métier peut avantageusement se référer aux méthodes de production et d'utilisation de polynucléotides antisens inhibant ou bloquant l'expression de gènes associés au développement de cancers, telles que les techniques décrites dans le brevet US N°5,582,986 qui divulgue des oligonucléotides antisens pour l'inhibition  
15 du gène ras, la technique décrite par HOLT et al. (1988) qui décrit des oligonucléotides antisens s'hybridant spécifiquement avec les ARNs messagers l'oncogène c-myb ou encore la technique décrite par WICKSTRON et al. (1988) qui décrit des oligonucléotides antisens hybridant spécifiquement avec l'ARN messenger du gène c-myc.

20 D'autres techniques d'utilisation de polynucléotides antisens utilisables par l'homme du métier sont celles de SALE et al. (1995) ainsi que celle de GAO et al. (1996).

## 25 **PROCEDE DE SELECTION D'UN COMPOSE ANTAGONISTE DE LA PROTEINE ESM-1**

Un composé antagoniste de la protéine ESM-1 selon l'invention peut être sélectionné par l'homme du métier pour sa capacité à inhiber le développement d'une tumeur induite par la protéine ESM-1 *in vivo*.

30 Selon un premier aspect, un procédé de sélection d'un composé antagoniste de la protéine ESM-1 comprend les étapes suivantes:

a) injecter à un animal des cellules capables de former des tumeurs en présence de la protéine ESM-1, lesdites cellules étant

transfectées ou transformées par un acide nucléique capable d'exprimer la protéine ESM-1 *in vivo*;

b) administrer à cet animal un composé candidat antagoniste de la protéine ESM-1;

5 c) comparer la formation de tumeurs chez un premier animal tel qu'obtenu à la fin de l'étape b) et chez un second animal tel qu'obtenu à la fin de l'étape a); et

d) sélectionner le composé candidat capable d'inhiber ou de bloquer la formation de tumeurs chez le premier animal.

10 De préférence, l'animal mis en oeuvre dans le procédé de sélection ci-dessus est un mammifère non humain, avantageusement un rongeur, et de manière tout à fait préférée un rat, un cobaye, un cochon d'Inde ou une souris.

Dans un mode de réalisation particulier du procédé, celui-ci  
15 comprend une étape e) consistant à sacrifier le premier et le second animal.

Avantageusement, la lignée cellulaire capable de former des tumeurs chez l'animal en présence de la protéine ESM-1 est la lignée HEK 293 (ATCC N°CRL 1573).

20 Selon un autre aspect, un composé antagoniste de la protéine ESM-1 selon l'invention peut être sélectionné selon un procédé permettant de mettre en évidence la fixation d'un composé candidat sur la protéine ESM-1. Un tel procédé de sélection d'un composé candidat antagoniste de la protéine ESM-1 comprend les étapes suivantes:

25 a) fournir un polypeptide consistant en la protéine ESM-1 ou un fragment peptidique de cette protéine;

b) mettre en contact ledit polypeptide avec le composé candidat à tester;

c) détecter les complexes formés entre ledit polypeptide et le  
30 composé candidat;

d) sélectionner les composés candidats se fixant sur le polypeptide constitué de la protéine ESM-1 ou d'un fragment de cette protéine.

Par « fragment » de la protéine ESM-1, on entend un  
35 polypeptide comprenant au moins 20, de préférence au moins 30, 35, 40,

50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140 ou 150 acides aminés consécutifs du polypeptide ESM-1 de séquence SEQ ID N°1 et comprenant la séquence allant du résidu proline en position 133 jusqu'au résidu valine en position 138 de la SEQ ID N°1.

5 L'invention est également relative à une trousse ou kit pour la sélection d'un composé candidat antagoniste de la protéine ESM-1, cette trousse ou kit comprenant:

a) une préparation purifiée d'un polypeptide constitué de la protéine ESM-1 ou d'un fragment de cette protéine;

10 b) le cas échéant, des moyens de détection d'un complexe formé entre le polypeptide et le composé candidat à tester.

Le procédé de détection d'un complexe formé entre le polypeptide dérivé de la protéine ESM-1 et le composé candidat peut-être réalisé par diverses techniques, telles que par microdialyse couplée  
15 à une méthode HPLC comme décrit par WANG et al. (1997) ou l'électrophorèse capillaire d'affinité comme décrit par BOUSH et al. (1997).

Un composé candidat peut être de toute nature, et notamment le produit final d'un procédé de chimie combinatoire.

20

## **A. COMPOSES CANDIDATS OBTENUS A PARTIR DE BANQUES DE PEPTIDES**

Un composé candidat antagoniste de la protéine ESM-1 peut  
25 être sélectionné selon le procédé ci-dessus en tant que produit d'expression d'un insert d'ADN contenu dans un vecteur de phage selon la technique décrite par PARMLEY & SMITH (1988). Dans ce type de banques peptidiques, les inserts d'ADN codent pour des peptides de 8 à 20 acides aminés de longueur, comme cela est décrit par OLDENBURG  
30 KR et al. (1992), VALADON P et al. (1996), LUCAS AH (1994), WESTERINK (1995), FELICI et al. (1991).

Selon ce mode de réalisation particulier, les phages recombinants exprimant une protéine capable de se fixer sur le polypeptide constitué de la protéine ESM-1 ou un fragment de celle-ci est  
35 retenu et le complexe formé entre la protéine ESM-1 ou un fragment de



celle-ci et le phage recombinant peut être ultérieurement immunoprécipité par un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-ESM-1.

## **B. COMPOSE CANDIDAT OBTENU PAR DES EXPERIENCES DE COMPETITION**

Les composés candidats antagonistes de la protéine ESM-1 peuvent être également sélectionnés en ce qu'ils se fixent sur la protéine ESM-1, ou sur un fragment polypeptidique de celle-ci, en compétition avec un composé antagoniste de la protéine ESM-1 sélectionné antérieurement tels que l'un des anticorps anti-ESM-1 décrits ci-dessus, et tout particulièrement l'anticorps monoclonal sécrété par la lignée d'hybridome MEP08 déposée le 19 Novembre 1997 auprès de la CNCM sous le n° d'accès I-1941.

De telles expériences de compétition sont par exemple décrites dans l'article de BECHARD et al. (2000).

## **C. COMPOSES CANDIDATS ANTAGONISTES DE LA PROTEINE ESM-1 SELECTIONNES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE.**

Des protéines ou d'autres molécules de toute nature capables de se fixer sur la protéine ESM-1, ou un fragment polypeptidique de cette protéine, peuvent être sélectionnées en utilisant des colonnes d'affinité sur lesquelles ont été immobilisées la protéine ESM-1 ou un fragment de cette dernière, par exemple en utilisant des techniques classiques, incluant un couplage chimique de la protéine ESM-1 ou d'un fragment de cette dernière à la matrice d'une colonne telle que de l'agarose, ou de l'AffiGel®. Une solution contenant le composé candidat à tester est mis en contact avec le support chromatographique sur lequel est immobilisée la protéine ESM-1 ou un fragment peptidique de celle-ci. Les composés retenus sur la colonne d'affinité sont sélectionnés positivement.

## **D. COMPOSES CANDIDATS SELECTIONNES PAR DES TECHNIQUES DE BIOCAPTEURS OPTIQUES**

Un composé candidat antagoniste de la protéine ESM-1 peut également être sélectionné en utilisant un biocapteur optique tel que décrit par EDWARDS et LEATHERBARROW (1997). Cette technique permet la détection d'interactions entre des molécules en temps réel sans nécessiter l'utilisation de molécules marquées. Cette technique est basée sur la résonance de surface du plasmon (SPR pour « Surface Plasmon Resonance »). Brièvement, le composé candidat à tester est fixé sur une surface, telle qu'une matrice de carboxyméthylidextran. Un rayon lumineux est dirigé sur l'extrémité de la surface qui ne contient pas l'échantillon à tester et est réfléchi par cette surface. Le phénomène SPR provoque une réduction d'intensité de la lumière réfléchie avec une association spécifique entre l'angle de la lumière réfléchie et la longueur d'onde du rayon lumineux. La fixation du composé candidat provoque un changement dans l'indice de réfraction de la surface, le changement d'indice de réfraction étant détecté comme une modification du signal SPR.

Un tel procédé de détection par biocapteur optique peut permettre également de sélectionner les composés candidats qui entrent en compétition avec un autre ligand pour la fixation sur la protéine ESM-1 ou un fragment peptidique de ce dernier.

Par exemple, un composé candidat antagoniste de la protéine ESM-1 englobe les composés capables d'inhiber la fixation d'un anticorps anti-ESM-1 sur la protéine ESM-1, d'inhiber la fixation du facteur HGF-SF ou encore des facteurs FGF-2 et FGF-7 sur la protéine ESM-1 ou un fragment peptidique de cette dernière.

Ainsi, selon encore un autre aspect, l'invention a trait à un procédé de sélection d'un composé antagoniste de la protéine ESM-1 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) mettre en contact la protéine ESM-1 ou un fragment peptidique de cette dernière en présence de :

(i) un composé antagoniste de la protéine ESM-1 se fixant sur la protéine ESM-1; et

(ii) un composé candidat à tester;

b) dans une étape séparée de l'étape a), mais éventuellement simultanée à cette dernière, mettre en contact la protéine ESM-1 ou un

fragment peptidique de cette dernière avec un composé antagoniste de la protéine ESM-1 se fixant sur la protéine ESM-1;

c) détecter la quantité respective du composé antagoniste de la protéine ESM-1 fixée à l'issue de chacune des étapes a) et b); et

5 d) sélectionner le composé candidat qui entre en compétition avec le composé antagoniste pour la fixation sur la protéine ESM-1.

De préférence, un composé antagoniste de ESM-1 pour la mise en oeuvre du procédé de sélection ci-dessus est un anticorps anti-ESM-1 ou encore un composé antagoniste peptidique tel que défini ci-avant  
10 dans la présente description.

Dans un premier mode de réalisation particulier d'un procédé pour sélectionner un composé antagoniste de ESM-1 à partir d'un composé candidat, ledit procédé comprend les étapes suivantes:

1) sélectionner, parmi les composés candidats, les composés  
15 qui se fixent sur la protéine ESM-1 ou sur un fragment peptidique de cette protéine;

2) administrer un composé sélectionné à l'étape 1) à un animal et déterminer la capacité de ce composé à inhiber, chez cet animal, le développement de tumeurs induites par la protéine ESM-1;

20 3) sélectionner les composés inhibiteurs du développement des tumeurs déterminées à l'étape 2) comme des composés antagonistes de la protéine ESM-1.

L'étape 1) consiste préférentiellement en la mise en oeuvre d'un procédé de sélection d'un composé candidat se fixant sur la protéine  
25 ESM-1 ou sur un fragment de celle-ci, choisi parmi les procédés détaillés dans la présente description.

L'étape 2) consiste préférentiellement en la mise en oeuvre d'un procédé de sélection d'un composé candidat *in vivo* tel que détaillé dans la description.

30 Dans un mode de réalisation particulier du procédé, celui-ci comprend également une étape 4) consistant à sacrifier l'animal.

**Composition pharmaceutique de l'invention.**

Un autre objet de l'invention consiste en une composition pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention d'un cancer  
5 comprenant un composé antagoniste de la protéine ESM-1.

**Composition pharmaceutique comprenant un composé antagoniste du type anticorps ou du type peptide selon l'invention.**

10 Selon un premier aspect, une composition pharmaceutique selon l'invention comprend une quantité thérapeutiquement efficace d'un anticorps anti-ESM-1 ou d'un composé antagoniste peptidique dérivé de ESM-1, en association avec un ou plusieurs véhicules  
15 pharmaceutiquement compatibles. Les compositions pharmaceutiques selon l'invention incluent celles adaptées pour une administration topique, orale, rectale, nasale ou parentérale (y compris intramusculaire, sous-cutanée et intraveineuse) ou encore sous une forme adaptée pour une administration par inhalation ou insufflation. Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être présentées sous forme  
20 d'unités de dosage et peuvent être préparées par toute méthode bien connue de l'homme du métier du domaine de la galénique pharmaceutique. Toutes les méthodes comprennent une étape consistant à associer le composé agoniste constituant le principe actif de la composition avec un véhicule liquide ou un véhicule solide finement  
25 divisé et, si nécessaire, mettre en forme le produit, par exemple sous forme de comprimés ou de gélules.

Pour une administration orale, une composition pharmaceutique selon l'invention est de préférence présentée sous la forme d'unités de dosages telles que des capsules, des comprimés ou des gélules.  
30 Lorsqu'elles se présentent sous une forme incluse dans un conteneur pressurisé, la composition pharmaceutique peut comprendre un agent propulseur tel que le dichlorodifluorométhane, le trichlorofluorométhane, le dichlorotétrafluoroéthane, le dioxyde de carbone ou d'autres gaz appropriés. Dans le cas d'un aérosol pressurisé, l'unité de dosage peut

être pourvue d'une soupape capable de libérer une quantité donnée de la composition pharmaceutique.

Selon un autre aspect, la composition pharmaceutique selon l'invention peut être sous la forme d'une composition de poudre sèche pour l'administration par inhalation ou insufflation, par exemple sous la forme d'un mélange de poudre du composé antagoniste et d'une poudre base adaptée, telle que le lactose ou l'amidon. La composition de poudre peut être présentée en unité de dosage, par exemple sous la forme de gélules ou de cartouches à partir desquelles la poudre peut être administrée à l'aide d'un dispositif inhalateur ou insufflateur.

Un véhicule solide pharmaceutiquement compatible d'une composition pharmaceutique selon l'invention englobe des substances telles que les agents de saveur, les lubrifiants, les solubilisants, les agents de suspension, les agents de charge, les auxiliaires de compression, les liants ou des agents désintégrant ainsi que les matériaux d'encapsulation. Dans les poudres, le véhicule est un solide finement divisé qui est en mélange avec le composé antagoniste de ESM-1 également sous la forme finement divisée. Dans les comprimés, le principe actif antagoniste de ESM-1 est mélangé avec un véhicule ayant des propriétés de compression adaptées et compactées sous la forme et la taille désirées. Les poudres et les comprimés contiennent de préférence moins de 99% du principe actif. Des véhicules solides préférés sont par exemple le phosphate de calcium, le stéarate de magnésium, le talc, les sucres, le lactose, la dextrine, l'amidon, la gélatine, la cellulose, la polyvinylpyrrolidone et les résines d'échange d'ions.

Des véhicules liquides sont utilisés pour préparer une composition pharmaceutique selon l'invention sous la forme d'une solution, une suspension, d'une émulsion, d'un sirop, d'un elixir et d'une composition pressurisée. Le principe actif antagoniste de la protéine ESM-1 peut être dissous ou suspendu dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable tel que de l'eau, d'un solvant organique, d'un mélange des deux ou des huiles ou matières grasses pharmaceutiquement acceptables. Le véhicule liquide peut contenir d'autres additifs pharmaceutiquement acceptables tels que des agents

solubilisants, des émulsifiants, des tampons, des conservateurs, des édulcorants, des agents aromatiques, des agents de suspension, des agents épaississants, des agents colorants, des régulateurs de viscosité, des stabilisants ou des osmo-régulateurs. Des exemples illustratifs de  
5 véhicules liquides pour administration orale et parentérale comprennent l'eau, les alcools (y compris les alcools monohydriques et polyhydriques comme les glycols), les huiles telles que l'huile de coco ou l'huile d'arachide fractionnée. Pour l'administration parentérale, le véhicule peut aussi être un ester tel que l'oléate d'éthyle et le myristate d'isopropyle.

10 Les compositions pharmaceutiques liquides sous la forme de solutions ou suspensions stériles peuvent être utilisées pour une injection intramusculaire, intrapéritonéale ou sous-cutanée.

De préférence, une composition pharmaceutique selon l'invention comprend de 1 à 1000 mg de composés antagonistes de la  
15 protéine ESM-1 par unité de dosage, et de préférence de 10 à 500 mg du composé antagoniste de la protéine ESM-1 par unité de dosage.

La présente invention concerne aussi une méthode de traitement et/ou de prévention d'un cancer comprenant une étape au cours de laquelle on administre à un patient ayant besoin d'un tel  
20 traitement une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus.

**Composition pharmaceutique comprenant un composé antagoniste de la protéine ESM-1 du type polynucléotide antisens.**

25 Font également partie de l'invention des compositions pharmaceutiques contenant une quantité thérapeutiquement efficace d'un composé antagoniste de la protéine ESM-1 du type polynucléotide antisens tel que défini dans la présente description ainsi que des méthodes de traitement et/ou de prévention d'un cancer comprenant  
30 l'administration à un patient ayant besoin d'un tel traitement d'une composition pharmaceutique comprenant un polynucléotide antisens tel que défini ci-dessus.

Un oligonucléotide antisens selon l'invention peut être administré par tout moyen, qu'il soit local ou systémique.

L'administration locale d'un polynucléotide antisens de l'invention, par exemple au niveau d'une tumeur, peut être réalisée par l'administration du polynucléotide antisens directement au niveau de la tumeur ou au niveau du tissu entourant la tumeur et permettant à  
5 l'oligonucléotide de migrer et, le cas échéant d'entrer, dans les cellules tumorales. Par exemple, les polynucléotides antisens peuvent être injectés à l'aide d'une seringue. L'injection peut être intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale ou sous-cutanée. Le polynucléotide antisens peut être administré au foie par l'intermédiaire du système de la  
10 veine porte hépatique. De même, le polynucléotide antisens peut être administré au poumon à l'aide d'un dispositif d'inhalation.

D'autres modes d'administration d'un polynucléotide antisens peuvent être utilisés. Par exemple, les polynucléotides antisens peuvent être administrés de manière systémique après leur insertion dans un  
15 vecteur d'expression. Le terme « vecteur d'expression », englobe un plasmide, un virus ou un autre véhicule connu dans l'état de la technique pour assurer l'expression d'un polynucléotide antisens.

Pour la mise en oeuvre de vecteurs adaptés pour l'expression recombinante d'un polynucléotide antisens, l'homme du métier pourra  
20 avantageusement utiliser des vecteurs pMSXND décrits par LEE et NATHANS (1988), des vecteurs viraux eucaryotes, tels que ceux décrits par GLUZMAN (1982), ou encore des adénovirus et des virus adéno-associés tels que ceux décrits dans les brevets US n°5,173,414 et 5,354,678 ou encore un système d'expression incluant le vecteur  
25 d'expression décrit par MOXHAM et al. (1993).

De préférence, le vecteur d'expression contient un promoteur permettant la production du polynucléotide antisens chez un animal, de préférence un mammifère, et de manière préférée chez l'homme, tel que le promoteur de la polyhédrine .

30 Le vecteur d'expression peut être adapté à l'expression ciblée du polynucléotide antisens au site de la tumeur, par exemple en plaçant l'acide nucléique codant pour les polynucléotides antisens sous le contrôle d'un promoteur spécifique de certaines cellules, telles que les cellules épithéliales ou les cellules endothéliales. Un exemple d'un tel  
35 promoteur est le promoteur viral désigné NuNTV qui est utile

spécifiquement dans le traitement des cancers du sein. D'autres exemples de tels promoteurs spécifiques sont des promoteurs de protéine du lait telle que la  $\beta$ -lactoglobuline, de la caséine- $\alpha$  et de la caséine- $\beta$ .

- 5           La quantité thérapeutiquement efficace d'un polynucléotide antisens de l'invention peut être déterminée comme la quantité nécessaire à une réduction significative de la traduction de la protéine ESM-1 au niveau systémique ou local.

10           Il apparaîtra clairement à l'homme du métier que la concentration du polynucléotide antisens thérapeutiquement efficace varie avec le choix de la forme d'administration. Par exemple, si le polynucléotide antisens est administré par injection à un mammifère, l'unité de dosage constituée d'une seringue contenant une quantité efficace du polynucléotide antisens. Une quantité efficace du  
15 polynucléotide antisens pour une administration systémique est comprise entre 0,01 mg/kg à 50 mg/kg administrée une fois ou deux fois par jour. Une quantité thérapeutiquement efficace d'un polynucléotide antisens selon l'invention incluse dans une composition pharmaceutique est comprise généralement entre  $10^4$  et  $10^{11}$  molécules de polynucléotide  
20 antisens par administration et de préférence entre  $10^5$  et  $10^{10}$  molécules d'ADN par administration.

          Cependant, différents protocoles de dosage peuvent être utilisés selon (i) la capacité individuelle du polynucléotide antisens à  
inhiber l'expression de la protéine ESM-1, (ii) la gravité ou l'étendue de la  
25 maladie, ou (iii) le comportement pharmacocinétique du polynucléotide antisens utilisé.

          Le polynucléotide antisens peut être associé à un véhicule pharmaceutiquement compatible ou à un excipient. Des exemples d'excipients comprennent les agents de charge, les liants, les agents  
30 désintégrants, les lubrifiants, selon la nature de l'administration et les formes de dosage. Des formes de dosage préférées consistent en des solutions liquides, avantageusement des tampons physiologiquement compatibles telles que des solutions de HANK's ou de RINGER. De plus, les polynucléotides antisens selon l'invention peuvent être formulés sous  
35 forme solide puis redissous ou resuspendus immédiatement avant



usage. Selon englobe les formes lyophilisées et les liposomes contenant de tels polynucléotides antisens.

Un polynucléotide antisens de l'invention peut aussi être administré de manière systémique par les voies transmuqueuses, transdermiques ou orales. Pour les voies d'administration transmuqueuses ou transdermiques, des agents pénétrant peuvent être utilisés dans la formulation tels que des sels biliaires ou des dérivés de l'acide fusidique.

La présente invention est également relative à une méthode de traitement et/ou de prévention d'un cancer comprenant une étape d'administration à un patient, ayant besoin d'un tel traitement, une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus comprenant un composé antagoniste de ESM-1 du type polynucléotide antisens.

De manière générale, l'une quelconque des compositions pharmaceutiques de l'invention telles que définies ci-dessus et comprenant une quantité thérapeutiquement efficace d'un composé antagoniste de la protéine ESM-1 est utile dans la prévention et/ou le traitement d'un cancer.

A titre illustratif, mais non limitatif, une composition pharmaceutique selon l'invention est utile pour la prévention et/ou le traitement de cancers tels que les cancers des voies respiratoires, les cancers broncho-pulmonaires, les cancers du sein, les cancers du colon et les cancers rénaux ainsi que les cancers des voies digestives.

La présente invention est en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures et les exemples suivants.

## FIGURES

La figure 1 illustre des gels d'immuno-empreinte (« Western-Blot ») et des colorations de ESM-1 sur gel SDS-PAGE.

Chaque gel d'immuno-empreinte a été révélé avec l'anticorps monoclonal anti-ESM-1 MEP14. Le second anticorps anti-souris marqué à la peroxydase de raifort a été purifié par affinité et donne des résultats négatifs lorsqu'il est utilisé seul.

**Figure 1A. Gel d'immuno-empreinte de la protéine ESM-1 de différents types cellulaires exprimant cette protéine.**

L'immuno-précipitation de ESM-1 à partir des surnageants de culture des cellules SVI (1), 293-ESM(2) et CHO-ESM(3) a été réalisée avec l'anticorps MEP19 lorsque cela est indiqué, ou avec un anticorps témoin. Les flèches indiquent la bande spécifique de ESM-1. La forme native de ESM-1 est représentée par une bande diffuse aux alentours de 50 kD.

10

**Figure 1B. Absence de détection de la protéine purifiée ESM-1 avec le bleu de coomassie.**

5 µg de protéine ESM-1 purifiée à partir des cellules SVI ont été chargés sur un gel SDS-PAGE à 15% et colorés au bleu de coomassie afin de détecter le corps peptidique de la molécule. Les flèches indiquent l'absence de détection de ESM-1.

15

**Figure 1C. Détection de la protéine ESM-1 purifiée avec le bleu alcian.**

20

5 µg de protéine ESM-1 purifiée à partir des cellules SVI ont été chargés sur un gel SDS-PAGE à 15% et ont été révélés par coloration au bleu alcian afin de détecter le corps glycanique de la molécule. La flèche indique la protéine ESM-1.

25

La figure 2 illustre le poids moléculaire apparent des corps peptidique et glycanique de ESM-1.

**Figure 2A. Analyse par mutation du site de fixation de O-glycosylation.**

30

Deux sites putatifs de O-glycosylation (tréonine 120 et sérine 137) ont été substitués par un résidu alanine par mutagenèse dirigée. La protéine ESM-1 sauvage (WT pour « Wild-Type »), les mutants de ESM-1 T120A et S137A ainsi que les témoins négatifs (MOCK) ont été

35

transfectés dans les cellules 293 et les surnageants de culture cellulaire ainsi que les lysats cellulaires ont été analysés par immuno-empreinte (Western-Blot) à l'aide de l'anticorps monoclonal MEP14. Les flèches indiquent les bandes spécifiques.

5

**Figure 2B. Effet d'un traitement à la protéinase K sur ESM-1.**

La protéine ESM-1 purifiée à partir des cellules SVI(1) et 293-ESM (2) a été digérée par la protéinase K et chargée sur un gel SDS-PAGE 15%. La flèche supérieure indique la forme sauvage de la protéine ESM-1 non traitée et la flèche inférieure indique la protéine ESM-1 digérée par la protéinase K.

La figure 3 illustre les effets de chondroïtinases spécifiques sur ESM-1.

15

**Figure 3A. Traitement de la protéine ESM-1 sauvage purifiée avec la chondroïtinase ABC.**

La protéine ESM-1 sécrétée a été purifiée par chromatographie d'échanges d'ions, suivie d'une chromatographie d'immuno-affinité à partir de surnageants de cultures de cellules SVI(1), 293-ESM(2) et à partir de plasma humain (3), puis digérée ou non par la chondroïtinase ABC. 50 ng de la protéine digérée ont été chargés sur un gel SDS-PAGE à 15% puis analysés par immuno-empreinte (Western-Blot). La flèche supérieure indique les formes non digérées de ESM-1 et la flèche inférieure indique les formes digérées de ESM-1.

20

25

**Figure 3B. Traitement de la protéine ESM-1 sauvage purifiée avec la chondroïtinase B.**

30

La protéine ESM-1 purifiée à partir de surnageants de culture des cellules SVI (1) et 293-ESM(2) ont été digérés ou non par la chondroïtinase. Les protéines ont été chargées sur un gel SDS-PAGE à 15% . La flèche supérieure indique les différentes formes de ESM-1 non

35

digérées autour de 50 kD et la flèche inférieure indique les différentes formes de la protéine ESM-1 digérée, autour de 22 kD.

**Figure 3C. Traitement de la protéine ESM-1 sauvage purifiée avec la chondroïtinase AC.**

La protéine ESM-1 purifiée à partir de surnageants de culture des cellules HUVEC (1) et 293-ESM(2) ont été virées??? par la chondroïtinase AC et ont été chargées sur un gel SDS-PAGE à 15%. La flèche supérieure indique les différentes formes de ESM-1 non digérées autour de 502 kD et la flèche inférieure indique les différentes formes digérées de la protéine ESM-1 autour de 22 kD.

**Figure 3D. Traitement de la protéine ESM-1 sauvage purifiée avec la chondroïtinase C.**

La protéine ESM-1 purifiée à partir de surnageants de cultures des cellules HUVEC (1) et 293-ESM(2) ont été digérées ou non par la chondroïtinase C et ont été chargées sur un gel SDS-PAGE à 15%. La flèche supérieure indique les différentes formes non digérées de ESM-14 autour de 50 kD et la flèche inférieure indique les différentes formes digérées de la protéine ESM-1 autour de 22 kD.

La figure 4 illustre les effets de la protéine ESM-1 sauvage purifiée sur le temps de coagulation en présence de thrombine. On peut noter le retard et la réduction dans la formation de thrombine pour le plasma hépariné ainsi que pour les quatre autres courbes (plasma riche en plaquette ou PRP: losange vide; plasma riche en plaquette + ESM-1 à 0,2 mg/ml: carré plein; plasma riche en plaquette + ESM-1 0 0,5 mg/ml: triangle plein; plasma riche en plaquette + ESM-1 à 1 mg/ml : cercle plein; plasma riche en plaquette + héparine: cercle vide).

La figure 5 illustre l'activité biologique du protéoglycane ESM-1 sur la prolifération des cellules 293 induites par le facteur HGF/SF. La stimulation de l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine par les cellules 293 induites par le facteur HGF/SF a été étudiée. Les cellules ont étéensemencées à  $1 \times 10^4$  cellules par puits dans du milieu DMEM

additionnées de transférine et d'insuline et de HGF/SF à 50 ng par ml avant addition de différentes molécules. Les barres représentent le pourcentage d'augmentation de l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine (moyenne  $\pm$  S.E.M. d'échantillons en triple d'une expérience représentative) en présence des additions indiquées de sérum, des différentes formes de ESM-1 à 2,5 mg/ml et de décorine à 2,5 mg/ml. Le bruit de fond d'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine en présence de HGF/SF a été généralement compris entre 7.000 et 8.000 cpm par puits. Les résultats présentés sont similaires à ceux obtenus dans trois autres expériences séparées.

La figure 6 illustre une étude de douze réponses des différentes formes de ESM-1 et de décorine sur l'activité mitogène induite par le facteur HGF/SF. On a étudié la stimulation de la synthèse d'ADN par les cellules 293 en présence de HGF/SF à 50 nanogrammes par ml seule ou en présence de différentes concentrations de la protéine sauvage ESM-1/WT (carré vide), de la protéine mutée non glycosylée ESM/S137A (cercle plein), de la chaîne GAG dérivée de la protéine ESM/WT (carré plein) ou de la décorine (cercle vide). Les valeurs moyennes de mesure en triple d'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine obtenues dans une expérience parmi trois expériences indépendantes sont représentées à la figure 6. Les résultats sont exprimés en cpm. Les déviations standard sont approximativement de 10%.

La figure 7 illustre le pouvoir tumorigène de la protéine ESM-1. Deux lots de plus de 10 souris ont reçu des cellules HEK témoins ou des cellules HEK transfectées avec un vecteur codant pour l'ADNc de la protéine ESM-1 sauvage (ESM/WT). Sur la figure 7A, le pourcentage de tumeurs macroscopiquement visibles à la huitième semaine au point d'injection et dont le volume tumoral est supérieur à  $1\text{ cm}^3$  est représenté en ordonnée. La figure 7B illustre la cinétique d'apparition des tumeurs chez des souris ayant reçu les cellules HEK transfectées exprimant la protéine ESM-1 glycosylée (ESM/WT). Le nombre de semaines après l'injection des cellules est représenté en abscisse. En ordonnée est représenté le volume tumoral moyen, exprimé en  $\text{cm}^3$ .

La figure 8 illustre la production de ESM-1 par les tumeurs induites chez la souris.

La figure 8A représente le taux sérique de protéine ESM-1 retrouvé chez les deux lots de souris, à la huitième semaine suivant l'injection des cellules. En abscisses sont représentés respectivement le lot de souris ayant reçu les cellules HEK témoins et le lot de souris ayant  
5 reçu les cellules HEK exprimant la protéine ESM-1 glycosylée (ESM/WT). Le taux sérique de ESM-1 retrouvé, exprimé en nanogramme/ml, est représenté en ordonnées.

La figure 8B illustre la cinétique des taux sériques de ESM-1 mesurées par ELISA, pour les souris du lot ayant reçu les cellules HEK  
10 transfectées avec un ADN codant pour la protéine ESM-1 glycosylée (ESM/WT). En abscisses sont représentés le nombre de semaines suivant l'injection des cellules transfectées. Le taux sérique de protéine ESM-1, et exprimé en nanogramme/ml, est représenté en ordonnées.

La figure 9 illustre l'activité tumorigène de différentes formes de  
15 la protéine ESM-1.

La figure 9A illustre l'apparition de tumeurs chez différents lots de souris, les souris ayant reçu respectivement les cellules HEK témoins, les cellules HEK transfectées avec un ADNc codant pour la protéine ESM-1 glycosylée (ESM/WT), les cellules transfectées avec la protéine  
20 ESM-1 non glycosylées (ESM/S137A) et les cellules HEK transfectées avec un ADNc codant pour la protéine ESM-1 mutée en positions 134 et 135 (ESM/F115A, F116A). En ordonnées est représenté le pourcentage de tumeurs macroscopiquement visibles à la huitième semaine au point d'injection dont le volume tumoral est supérieur à 1 cm<sup>3</sup>.

La figure 9B illustre le taux sérique de ESM-1 chez les différents  
25 lots identiques de souris. Le taux sérique de ESM-1, exprimé en nanogramme/ml, est représenté en ordonnées.

La figure 10 illustre l'effet inhibiteur de l'anticorps monoclonal MEP08 sur l'activité pro-tumorale de la protéine ESM-1.

L'injection d'anticorps MEP-08 augmente la survie des souris du  
30 groupe HEK ESM/WT. Les anticorps monoclonaux MEP-08 sont injectés par voie intrapéritonéale à la dose de 400 µg à partir de la deuxième suivant l'inoculation des cellules HEK/ESM-WT. Les injections sont répétées de façon hebdomadaire pendant 12 semaines. Un anticorps  
35 contrôle, MEP-14, est utilisé dans les mêmes conditions. Les souris sont

sacrifiées lorsque leur volume tumoral est supérieur à 6 cm<sup>3</sup>. (n > 8 souris dans chaque groupe). La figure représente le pourcentage de souris vivantes dans chacun des groupes.

5 **EXEMPLES:**

**EXEMPLE 1**

**Modification post-traductionnelle de la forme sécrétée de la protéine ESM-1.**

10 **A. Matériels et Méthodes**

**A.1 Culture cellulaire et matériels**

Les cellules CHO ont été cultivées dans un milieu de culture. MAM $\alpha$  (Gibco BRL, Life Technologies, France) additionné de 10% de  
15 sérum de veau foetal. Les cellules endothéliales humaines transfectées par le virus SV40, les cellules SV1 décrites par LASSALLE P et al. (1992) ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 contenant 2mM de L-glutamine et 10% de sérum de veau foetal. Les cellules de reins  
20 embryonnaire humaine, les cellules de la lignée 293, ont été cultivées dans du milieu DMEM de Dulbecco avec 10% de sérum de veau foetal. Les cellules rénales embryonnaires humaines, cellules de la lignée 293, utilisées pour le test de prolifération ont été cultivées dans du milieu de  
EAGLE modifié de Dulbecco (Gibco BRL) complémenté avec de  
25 l'insuline à 10 mg/ml et de la transférine à 10mg/ml. La protéinase et la chondroïtinase ABC sont commercialisée par Boehringer Mannheim. Les chondroïtinases B, AC et C sont commercialisées par Sigma Le facteur HGF/SF humaine est commercialisé par R & D et la décorine est commercialisée par Sigma. Des anticorps monoclonaux anti-ESM-1 ont  
30 été produits et purifiés comme décrit par BECHARD et al. (2000).

**A.2 Développement de lignées cellulaires exprimant ESM-1.**

L'ADNc complet codant pour ESM-1 a été dirigé, purifié et  
35 inséré dans le vecteur d'expression pcDNA3 (commercialisé par

Invitrogen) entre les sites XhoI et HindIII. La construction de vecteurs a été transfectée dans des lignées cellulaires CHO et 293 en présence de lipofectamine (GIBCO BRL), puis sélectionnées sur G418 (1000 µg/ml pour la lignée CHO et 300 µg/ml pour la lignée 293). Les lignées cellulaires transfectées de manière stable ont été obtenues par dilution limite et les cellules ainsi sélectionnées ont été désignées respectivement CHO-ESM et 2936-ESM

### **A.3 Détermination du site de o-glycosylation de ESM-1 par analyse par mutation.**

2 sites potentiels de O-glycosylation ont été prédits à l'aide du logiciel NET O glyco Prediction Serveur.

On a substitué le résidu sérine en position 137 (SEQ ID N°1) et la thréonine en position 120 (SEQ ID N°1) par un résidu alanine. Les mutants de O-glycosylation ont été produits par PCR à l'aide du kit Quick Change de mutagenèse dirigé selon les recommandations du fabricant (Stratagene).

Les ADNc mutés ont été confirmés par séquençage (séquenceur ABI prism 377 de la Société Applied Biosystems. Puis les cellules 293 ont été transfectées avec les vecteurs dans lesquels ont été insérés les ADNc mutants pour obtenir des transfectants transitoires et des transfectants stables, respectivement les lignées 293-ESM/S 137A et 293-ESM/T120A.

25

### **A.4. Purification du protéoglycane ESM-1 chondroïtine/dermatane sulfate.**

Les surnageants de culture cellulaire ont été ajustés à pH8, puis passés sur une colonne de DEAE-Sepharose (Pharmacia), lavés avec un tampon 50 mM Tris (pH8), 0,2 M NaCl, puis élués dans un tampon 50 mM Tris (pH8), 0,8 M NaCl.

Les éluats ont été ajustés à 50 mM Tris (pH8), 0,5 M NaCl et passés sur une colonne d'affinité. La colonne d'affinité est constituée d'anticorps monoclonaux anti-ESM-1 (produits par la lignée d'hybridome

35



MEC4) immobilisés sur un gel Affigel Hz hydrazide, selon les recommandations du fabricant (Biorad).

Après une étape de lavage avec un tampon 50 mM Tris (pH8), MNaCl 0,5, la protéine ESM-1 a été éluée avec une solution de 3M de MgCl<sub>2</sub>, concentrée et dialysée contre le même tampon sur un dispositif ultrafree 30 (millipore).

Le matériau élué a ensuite été quantifié par immunodétection avec des anticorps anti-ESM-1, et contrôlés sur SDS-PAGE à l'aide d'une coloration au bleu de coomassie ou bleu alcian.

La purification de la protéine ESM-1 à partir du plasma humain a été réalisée selon le protocole suivant.

800 ml de plasma fourni par l'établissement de transfusion sanguine (Lille, France) ont été précipités avec une solution à 60% de sulfate d'ammonium et dialysés contre un tampon 50 mM Tris (pH 8), 0,5 MNaCl. L'extrait de plasma précipité et dialysé a ensuite été passé sur une pré-colonne de 50 ml du type Affigel (Biorad) avant un passage sur la colonne d'immunoaffinité anti-ESM-1. La protéine ESM-1 fixée sur la colonne d'immunoaffinité a été récupérée comme décrit ci-dessus.

La forme non glycosylée de ESM-1 (ESM/S137A) a été purifiée en une seule étape par chromatographie et d'immunoaffinité. Le degré de pureté de la protéine ESM-1 glycosylée (ESM/WT) et de la protéine non glycosylée mutée sur la sérine 137 (ESM/S137A) a été contrôlée par FPLC. Le matériau purifié est exempt d'endotoxines, comme en témoigne les résultats du test de lysat de limulus amebocyte (BIOwhitaker).

#### **A.5 Immunoprécipitation, immuno-empreinte et séquençage.**

La taille des différentes formes de ESM-1 a été déterminée par immunoprécipitation et immuno-empreinte à partir des surnageants de cultures cellulaires et des lysats cellulaires. Les cellules ont été lysées dans un tampon contenant 0,5% de NP40, un cocktail d'anti-protéases (Boehringer Mannheim, Allemagne) dans du PBS pendant 30 minutes à 4°C en agitation.

Puis, les lysats ont été centrifugés à 10.000g pendant 15 min afin d'obtenir des lysats cellulaires clarifiés.

Les surnageants de culture ont été filtrés sur un filtre ayant un diamètre de pore de 0,45 µm.

5           1 µg de l'anticorps monoclonal ESM-1 produit par la lignée d'hybridome MEP19 ou 1 µg d'anticorps monoclonal anti-ICAM-1 (clone 164B) a été ajouté au lysat clarifié ou au surnageant de culture cellulaire et incubé pendant une nuit à 4°C sous agitation.

10           50 µl d'une immunoglobuline anti-souris conjugué à des billes d'agarose (sigma) ont été ajoutés à 4°C pendant 90 min, avant centrifugation et de lavage avec un tampon de lyse et de lavage dans du PBS.

15           Les billes ont été resuspendues dans 20 et 40 µl de tampon SDS-PAGE pendant 5 min, centrifugées, et les surnageants ont été analysés.

Les échantillons ont été soumis à une électrophorèse sur gel SDS-PAGE, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose selon des procédures standard.

20           Après une étape de blocage, les membranes ont été incubées pendant une heure avec un anticorps monoclonal ESM-1 produit par la lignée d'hybridome MEP14 à 1 µl, lavées puis incubées pendant 1 heure avec un anticorps secondaire anti-Fc de souris conjugué à la peroxydase de raifort (« Horse Radish peroxydase ») (commercialisé par la Société SIGMA). On a réalisé plusieurs lavages avant révélation en utilisant le kit  
25 de détection ECL commercialisé par la Société Amersham.

Pour l'analyse de la séquence d'acides aminés, la protéine ESM-1 purifiée a été soumise à une électrophorèse sur un gel SDS-PAGE, puis électrotransférée sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) commercialisée par la Société MILLIPORE, puis colorée à l'aide  
30 de 0,1% de bleu de coomassie. La bande protéine à 50 kD a été excisée de la membrane et la séquence N-terminale a été effectuée par dégradation d'EDMAN automatisée sur un séquenceur de protéine du type ABI 473A.

#### 35    **A.6 Digestion du corps peptidique de ESM-1 par la protéinase K**

Afin de déterminer la taille du glycosaminoglycane, la protéine ESM-1 purifiée a été digérée avec la protéinase K avec un rapport enzyme:ESM-1 égal à 1:50 (poids:poids) dans un tampon Tris 10mM, pH8, en présence ou en absence de 0,1% SDS à 56°C pendant 3 heures. Une quantité 10 supérieure de sérum albumine bovine (BSA) à la protéine ESM-1 a été digérée par la protéinase K afin de vérifier sa dégradation complète. Les échantillons ont été analysés sur un gel de 12 % SDS-PAGE, suivi par une coloration au bleu de coomassie et au bleu alcian.

#### **A.7 Digestion de ESM-1 par les chondroïtinases ABC, B, AC et C**

Afin d'analyser la nature de la substitution de glycosaminoglycane, la protéine ESM-1 purifiée a été digérée avec plusieurs chondroïtinases: chondroïtinases ABC (0,5 unité/ mg dans un tampon 100 mM TrisHCl, pH 8, 30 mM d'acétate de sodium, pH 5,2 à 37°C pendant 45 min), chondroïtinase B (200 unités/mg dans un tampon 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,01% BSA, pH 7,5 à 25°C pendant deux heures), des chondroïtinase AC (une unité par ml dans un tampon 250 mM Tris HCl, 75 mM acétate de sodium, pH 7,3 à 37°C pendant deux heures) des chondroïtinases C (80-120 unités/ml dans un tampon 50 mM Tris HCl , pH 8 à 25°C pendant 3 heures). Les échantillons ont été analysés par immuno-empreinte.

#### **A.8 Activité anti-coagulante.**

Le plasma témoin pauvre en plaquette (PPP) a été préparé à partir de sang en présence de l'anticoagulant citrate de sodium (30mM), par centrifugation à 2500 g pendant 15 min. Tous les réactifs sont commercialisés par la Société STAGO Diagnostica (France). Trois paramètres ont été évalués, en ajoutant la protéine ESM-1, du tampon ou de l'héparine au plasma pauvre en plaquette:

a) APTT (pour « Activated Partialo Thromboplastin Time »): ce paramètre explore la voie intrinsèque de la coagulation sanguine (FI, FII,

FV, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII). Le déficit ou l'inhibition de l'un de ces facteurs augmente le temps de coagulation du mélange réactif PPP, céphaline, activateur,  $\text{CaCl}_2$ .

5 b) TCT (pour « Thrombin Clotting Time »): ce paramètre est analysé sur un mélange de plasma pauvre en plaquette (PPP) en présence de thrombine. Avec une concentration standard de thrombine, le temps de coagulation du plasma est constant. Des défauts dans la formation de fibrine induisent une augmentation du temps de coagulation.

10 c) activité anti-Xa: l'activité anti-Xa de l'héparine ou d'autres inhibiteurs agissant sur le facteur FXa est détectée par un test compétitif. L'échantillon étudié (PPP + ESM-1, + tampon ou + héparine) est mélangé avec le facteur Fxa et un substrat chromogène spécifique du facteur Fxa. La coloration finale est inversement proportionnelle à la  
15 concentration d'inhibiteur.

#### **A.9 Test de génération de la thrombine**

Ce test global sensible peut détecter des défauts plasmatiques  
20 ou dans les plaquettes induisant un retard ou une réduction dans la génération de thrombine. A partir de sang, un plasma riche en plaquettes (PRP) a été préparé à partir de sang en présence de citrate de sodium par centrifugation à 150 g pendant 10 min. Le test de génération de la thrombine a été réalisé, pour chacun des sujets, dans des échantillons  
25 en l'absence de ESM-1, avec de l'héparinate de calcium non fractionnée (0,5 UI de anti-Xa/ml) ou avec 0,2mg/ml, 0,5 mg/ml et 1 mg/ml de ESM-1 (concentration finale).

La protéine ESM-1 a été ajoutée 10 min avant le test.

A 37°C, 1 ml de plasma a été mélangé avec 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  et le  
30 chronomètre a été déclenché. Des fractions aliquotes de 0,1 ml ont été reprises du mélange réactif chaque minute pendant 1 min.

Le caillot formé dans le mélange réactif est régulièrement éliminé. Les fractions aliquotes ont été mélangées avec 0,2 ml de fibrinogène (Sigma, 4/1000 dans du tampon Owren à 37°C et le temps  
35 de coagulation a été mesurée pour chacune des fractions aliquotes).

La thrombine formée dans le mélange réactif agit sur les forminogènes, induisant la formation de fibrine. L'activité de coagulation était maximale entre 4 et 8 min puis a diminué du fait de la neutralisation de la thrombine par l'anti-thrombine.

5

#### **A.10 Chromatographie analytique par filtration sur gel**

50 µg de ESM-1 glycosylée (ESM/WT) purifiée et de ESM-1 non glycosylée (ESM/S137A) purifiée dans du tampon 50 mM Tris, pH 8,5, 0,5 M NaCl ont été séparées par chromatographie liquide sur une colonne Superdex 200 (pour ESM/WT) ou Superdex 75 (pour ESM/S137A) commercialisée par Pharmacia, en utilisant le système de chromatographie Biorad Biologic Chromatography System avec un débit de 1 ml/min.

15

Comme standard, on a utilisé le kit de calibration de haut et bas poids moléculaire (Pharmacia Biotech) suivant : ribonucléase A (de pancréas bovin, 13,7 kD), ovalbumine (43 kD) albumine (sérum bovin, 67 kD), aldolase (muscle de lapin, 158 kD), ferritine (raté de cheval, 440 kD), thyroglobuline (thyroïde bovine, 669 kD).

20

Les standards de poids moléculaire ont été séparés en utilisant un tampon identique à celui utilisé pour les protéines ESM-1 et la séparation a été réalisée immédiatement après la séparation des protéines ESM/WT et ESM/S137A. Le temps d'élution des protéines standard a été utilisé pour construire une courbe linéaire standard,  $K_{av} = f(\log MR)$  afin de déterminer le poids moléculaire apparent respectif des protéines ESM/WT et ESM/S137A.

25

Des fractions de 1 ml ont été recueillies et la protéine ESM-1 a été détectée à l'aide d'un test immunoenzymatique (ELISA) spécifique.

30

#### **B. RESULTATS**

**B.1 Modifications post-traductionnelles de la forme sécrétée de la protéine ESM-1 produite par les cellules endothéliales et par des lignées cellulaires établies.**

35

Afin de déterminer si ESM-1 était maturée comme une molécule sécrétée, comme cela a été suggéré par la présence d'une séquence d'acides aminés N-terminale prédite comme un peptide signal, la protéine ESM-1 a été purifiée à partir de la lignée cellulaire 293-ESM.

5 La séquence N-terminale de la forme de 50 kD a indiqué que le peptide signal de 19 acides aminés était clivé au site prédit, résultant en un polypeptide ESM-1 mature de 165 acides aminés commençant au résidu tryptophane en position 20 de la séquence SEQ ID N°1, la séquence N-terminale étant « WSNNYAVD-P ».

10 ESM-1 a été immunoprécipité à partir des surnageants de cultures cellulaires des cellules HUVEC, SV1, 293-ESM et CHO-ESM, puis analysés par immuno-empreinte.

Dans les surnageants des cellules HUVEC, il a été montré précédemment que ESM-1 migrerait sous la forme d'une bande diffuse à environ 50 kD.

15 Une bande similaire en taille a été observée avec les surnageants des cellules SV1, 293-ESM et CHO-ESM (figure 1A).

Le poids moléculaire retrouvé est plus important que le poids moléculaire prédit. Ce résultat a suggéré que la forme sécrétée de ESM-1 avait subi des modifications post-traductionnelles. Le fait que la protéine ESM-1 purifiée était mieux colorée sur le gel SDS-PAGE avec le bleu alcian qu'avec le bleu de coomassie a suggéré que ESM-1 était glycosylée (figures 1B, 1C) plutôt que oligomérisée au travers de pont disulfure, du fait que des conditions réductrices ne modifient pas le poids moléculaire apparent de ESM-1.

## **B.2. Le résidu sérine en position 137 (SEQ ID N°1) est le site de O-glycosylation de ESM-1.**

30 Une analyse par ordinateur des sites de glycosylation potentielle a permis d'identifier trois sites putatifs de O-glycosylation, respectivement pour la sérine en position 16, sur la thréonine en position 120 et sur la sérine en position 127, mais aucun site de N-glycosylation.

Le résidu thréonine en position 120 et le résidu sérine en position 137 ont été mutés et remplacés par un résidu alanine.

Ces mutants ont été exprimés de manière transitoire dans les cellules 293.

La protéine ESM-1 a ensuite été immunoprécipitée à partir des lysats cellulaires et des surnageants de culture, et analysés par immuno-  
5 empreinte.

La protéine ESM/T120A migre à 50 kD, à une position similaire au poids moléculaire apparent de la forme sauvage de ESM-1 (ESM/WT), comme cela est montré à la figure 2A.

Au contraire, la protéine ESM/S137A migre à 22 kD  
10 correspondant à la forme intra-cellulaire de ESM-1 (figure 2A), un poids moléculaire compatible avec le poids moléculaire prédit de ESM-1.

Les immunoprécipitations réalisées à partir des cellules COS et CHO transfectées transitoirement ont donné les mêmes résultats, indiquant que seul le résidu sérine en position 137 constituait un site de  
15 glycoconjugaison dans tous les modèles cellulaires étudiés.

Afin de déterminer la longueur du glycosaminoglycane (GAG) de ESM-1, le corps peptidique de ESM-1 a été complètement digéré par la protéinase K.

Le traitement par la protéinase K induit un changement dans le  
20 poids moléculaire de 50 kD à 25-30 kD (figure 2B). Ces résultats montrent que la bande de poids moléculaire apparent à 50 kD est compatible avec la présence d'un polypeptide de 22 kD qui est glycoconjuguée sur la sérine en position 137 par une chaîne GAG d'une taille moyenne de 25-30 kD.

25

### **B.3 La chaîne GAG DE ESM-1 est sensible à la chondroïtinase ABC**

Afin de caractériser la chaîne GAG de ESM-1, la protéine ESM-1 a été tout d'abord digérée par la chondroïtinase ABC. Le traitement par  
30 la chondroïtinase ABC a réduit le poids moléculaire de la protéine ESM-1 sécrétée à 22 kD (figure 3A), suggérant que le carbohydrate de ESM-1 est une chaîne du type chondroïtine.

Le profil est similaire avec la protéine ESM-1 purifiée à partir des cellules 293-ESM ainsi qu'à partir de la lignée cellulaire endothéliale  
35 humaine SVI. Du fait que la protéine ESM-1 circule dans le sang, non a

également étudié le comportement de la protéine ESM-1 purifiée à partir de plasma humain. Les résultats permettent d'observer une bande unique principale de 50 kD, qui a un poids moléculaire de 22 kD après traitement avec la chondroïtinase ABC, comme pour l'ensemble des autres lignées cellulaires étudiées (figure 3A). Ainsi, la protéine ESM-1 est un protéoglycane soluble contenant une chaîne unique de sulfate de chondroïtine.

#### **B.4 La chaîne GAG de ESM-1 est une chaîne hétérogène de chondroïtine/dermatane sulfate.**

Afin de mieux déterminer le type de motif dit « saccharidiques » qui constitue la chaîne GAG de ESM-1, on a utilisé plusieurs enzymes spécifiques, telles que les chondroïtinases B, AC et C.

Le traitement à la chondroïtinase B réduit le poids moléculaire apparent de 50 kD à 22 kD (figure 3B).

Un profil similaire a été observé après traitement de l'ESM-1 par les chondroïtinases AC et C (figures 3C, D).

Ces traitements enzymatiques différents indiquent que la chaîne GAG de ESM-1 contient différents motifs composites contenant un type de sucre aminé, la N-acétylgalactosamine, couplée à l'acide iduronique ou glucuronique différemment sulfatée.

Ces différents motifs seraient pris en alternance dans la chaîne, et seraient présents au début de la chaîne, à proximité des dissacharides sulfatés N-terminaux qui persistent sur le corps protéique après digestion à la chondroïtinase, du fait que tous les traitements à la chondroïtinase conduisent aux mêmes poids moléculaire apparents réduits de 22 kD.

#### **B.5. Activité biologique du protéoglycane soluble ESM-1 sur la coagulation**

Du fait que la protéine ESM-1 est sécrétée comme un protéoglycane du type chondroïtine/dermatane sulfate par les cellules endothéliales et du fait que le sulfate de dermatane présente des effets sur la génération de thrombine *in vitro* DELORME et al., (1996) et sur la coagulation, l'activité anticoagulante potentielle de ESM-1 a été vérifiée



sur les paramètres APTT, TCT, l'activité anti-Xa et sur la génération de thrombine.

Les résultats sont représentés dans le tableau 1 ci-après.

**TABEAU 1**

**Activité biologique du protéoglycane ESM-1 sur la coagulation**

	APTT(sec)	TCT(sec)	Activité Anti-Xa (UI/ml)
PPP + tampon	30,6	16,5	0
PPP + ESM-1 (0,2 µg/ml)	30,8	17,5	0
PPP + ESM-1 (0,5 µg/ml)	31	18,8	0
PPP + ESM-1 (1 µg/ml)	31,8	20,7	0
PPP+ héparine	89	39	0,45

Les résultats du tableau 1 montrent que la protéine ESM-1 aux différentes doses importantes de 0,2 mg/ml à 1 mg/ml ne modifient pas les différents paramètres testés.

Les paramètres APTT, TCT et activité anti-Xa sont similaires pour le plasma pauvre en plaquettes (PPP) avec le tampon ou avec la protéine ESM-1.

Dans les témoins positifs, les activités APTT, TCT et anti-Xa sont plus grandes pour le PPP en présence d'héparine.

De plus, la protéine ESM-1 n'a pas d'effet inhibiteur sur le test de génération de la thrombine: on observe aucune différence selon les concentrations de 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml et 1 mg/ml de ESM-1 par rapport au témoin tampon, alors que l'héparine induit un retard dans la formation de thrombine (figure 4).

**EXEMPLE 2:**

**Effet de la protéine ESM-1 sur l'activité mitogène du facteur HGF/SF**

**A. Matériels et Méthodes**

L'activité de stimulation de la prolifération a été déterminée en mesurant l'incorporation de <sup>3</sup>H thymidine par les cellules 293.

Les cellules 293 ont étéensemencées à la concentration de  $1 \times 10^4$  cellules par puits dans des microplaques à 96 puits du type TPP et ont été maintenues pendant 24 heures dans le milieu de culture DMEM additionnées de transférine et d'insuline.

5 Le HGF/SF recombinant humain a été dilué dans du PBS contenant 0,1% de sérum albumine bovine et ajouté par l'eau de 3 puits identiques afin d'obtenir une concentration finale de 50 ng/ml.

Les protéines recombinantes ESM/WT, ESM/S137A, la chaîne GAG purifiée dérivée de ESM-1 et la décorine ont été ajoutées seules ou  
10 en association avec le facteur HGF/SF à des doses allant de 1ng/ml à 2,5 µg/ml, simultanément à l'addition de HGF/SF.

Après 96 heures de culture, les cellules ont été incubées avec 0,5 µCi de  $^3\text{H}$  thymidine par puits pendant 16 heures et l'incorporation de  $^3\text{H}$  thymidine a été déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation du  
15 type Topcount Microplate Scintillation Counter (Packard).

Les tests ont été réalisés sur des lots de trois puits identiques.

La viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide du test de réduction de MTT.

## 20 B. RESULTATS

L'effet de la protéine ESM-1 sur l'activité du facteur HGF/SF a été étudié.

L'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine par les cellules 293 a été  
25 mesurée en présence de HGFSF à 50 ng/ml seule ou en association avec différentes quantités de ESM/WT.

Dans un premier lot d'expériences, on a observé que le HGF/SF seul à 50 ng/ml induisait une prolifération des cellules 293 à un niveau égal à environ 45% de la prolifération induite par le sérum, alors que la  
30 protéine ESM/WT seule ne stimulait pas la prolifération des cellules 293.

En revanche, lorsqu'elle est combinée au facteur HGF/SF, la protéine ESM/WT augmente considérablement la prolifération des cellules 293 induites par HGF/SF avec une augmentation de 162,3%, lorsque la protéine est testée à la concentration de 2,5 µg/ml (figure 5).

Cet effet d'augmentation de la protéine ESM-1 sur l'activité HGF/SF est dépendant de la dose ESM-1 et commence à être significative à la dose de 10 ng/ml (figure 6).

De plus, on a comparé l'effet de la protéine ESM/WT à l'effet de la décorine, un autre protéoglycane du type chondroïtine sulfate/dermatane sulfate, sur l'activité mitogène du facteur HGF/SF. Au contraire de la protéine ESM/WT, la décorine ne présente aucune activité d'augmentation de la prolifération des cellules 293 induites par le facteur HGF/SF (figures 5, 6).

Ces résultats indiquent que la protéine ESM-1 a un effet spécifique sur l'activité mitogène du facteur HGF/SF.

Afin d'examiner l'implication respective du corps protéique de ESM-1 et de la chaîne GAG sur l'activité d'augmentation de l'effet mitogène, on a mesuré l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine par les cellules 293 en présence de HGF/SF additionnées de différentes concentrations de ESM/S137A non glycosylée et de la chaîne GAG dérivée de ESM-1.

La forme non glycosylée de ESM-1 est incapable d'induire une prolifération des cellules 293, que ce soit en présence ou en l'absence du facteur HGF/SF (figure 5), même lorsque elle est utilisée à haute concentration.

Au contraire, la chaîne GAG purifiée à partir de ESM-1 augmente considérablement la prolifération des cellules 293 induites par le facteur HGF/SF, avec un facteur d'augmentation proche de 96,6%, comparée au facteur HGF/SF seul (figure 5). L'effet pro-mitogène de la chaîne GAG est moindre que celui observé avec la forme sauvage de la protéine ESM-1, mais cet effet est néanmoins dépendant de la dose de chaîne GAG ajoutée (figure 6).

Les résultats détaillés ci-dessus démontrent clairement que la protéine ESM/WT augmente la prolifération des cellules 293 induites par le facteur HGF/SF et que cette activité pro-mitogène est spécifique et due à la chaîne GAG du type chondroïtine sulfate/dermatane sulfate de ESM-1.

De manière générale, le facteur HGF/SF est exprimé durant les critiques périodes précoces de l'organogénèse humaine de 6 à 13 semaines de gestation. Les organes qui expriment le gène de HGF/SF

sont notamment le foie, le rein métanéphrique, l'intestin et le poumon, chacun de ces organes se développant par interaction inductive entre le mésenchyme et l'épithélium. De plus, le facteur HGF/SF est un facteur important dans la dysplasie multicystique rénale humaine (TAKAYAMA et al., 1997) ainsi que dans l'apparition de malformation et d'hyperprolifération dans les tubules. Les résultats présentés ci-dessus indiquent que la protéine ESM-1 augmente significativement la prolifération des cellules du rein embryonnaire en présence de HGF/SF alors que la forme non glycosylée et de la protéine ESM-1 n'a pas d'effet. De plus, la chaîne GAG isolée à partir de la protéine ESM-1 est capable de mimer les effets de la protéine glycosylée ESM/WT. Ces résultats démontrent clairement que l'activité biologique de ESM-1 sur la fonction du facteur HGF/SF est médiée principalement par sa chaîne GAG. On peut noter que la décorine, un autre protéoglycane du type chondroïtine sulfate/dermatane sulfate sécrété par les cellules endothéliales et qui est capable de se fixer sur le facteur HGF/SF (CELLA et al., 1992) n'a pas d'effet sur l'activité de HGF/SF. Ces comparaisons indiquent une spécificité d'action de la protéine ESM-1 sur l'activité du facteur HGF/SF requérant une composition de la chaîne GAG différente de la chaîne GAG des protéoglycanes appartenant à la famille des protéoglycanes à petites répétitions riches en leucine (« small leucine rich repeats »).

Dans le rein, la protéine ESM-1 est détectée sélectivement dans les tubules distaux, le résultat qui peut être associé à l'observation de la localisation préférentielle du facteur HGF/SF dans la même partie du néphron dans des situations de dysplasies multicystique rénale humaine (WEIDNER et al., 1993). Ces résultats indiquent une application de la protéine ESM-1 dans des troubles pathologiques dépendant du facteur HGF/SF, qui a également été montré comme étant associé dans le développement de cancers du sein (RAHIMI et al., 1998), du rein (NATALI et al., 1996) et du poumon (OTSUKA et al., 1998) mais aussi dans les mélanomes malins (SIEGFRIED et al., 1998). Ainsi, le facteur HGF/SF est susceptible de favoriser l'extension de l'hyperplasie et d'engendrer des cellules avec un phénotype invasif. La protéine ESM-1 est susceptible d'être impliquée dans ces phénomènes d'activités mitogènes dérégulés du facteur HGF/SF.

**EXEMPLE 3 :****Préparation d'un composé antagoniste de la protéine ESM-1 du type anticorps.**

5                    Afin d'obtenir des anticorps monoclonaux anti-ESM-1 dirigés contre la région N-terminale de la protéine ESM-1 riche en résidus cystéine, la forme native de la protéine ESM-1 produite par la lignée cellulaire CHO transfectée par un vecteur d'expression contenant un  
10                    insert d'ADN codant pour la protéine ESM-1 a été purifiée.

                    L'ADNc de ESM-1 est inséré dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 (In vitrogen) puis transfecté dans les cellules CHO avec la lipofectamine (GIBCO) selon les recommandations du fabricant. 48 heures après la transfection les cellules sont repiquées en présence  
15                    d'un agent de sélection (G418, Gibco) à la dose de 1000 microgramme/ml). Après deux semaines de sélection, les cellules CHO résistantes au G418 sont clonées par dilution limite. Des clones exprimant ESM-1 sont ensuite sélectionnés et appelés CHO-ESM (déposé à la CNCM).

20                    Pour la production, les cellules CHO-ESM sont cultivées en suspension dans un milieu conditionné sans sérum de veau foetal (milieu CHO SFM II; Gibco). Le surnageant est ajusté à pH 8 et paessé sur une colonne de DEAE-sépharose (Pharmacia). La colonne est lavée avec un tampon 50 mM Tris, pH 8, 0,2 M NaCl. La molécule ESM-1 est éluée  
25                    dans un tampon 50 mM Tris, pH 8, 1 M NaCl. L'éluat est ensuite dilué au 1:4 dans un tampon 50 mM Tris, pH 8 et incubé en présence d'anticorps monoclonal anti-ESM-1 (MEC4) immobilisé sur agarose (Biorad). Après une nuit d'incubation à 4°C sous agitation les billes d'agarose sont lavées avec le tampon 50 mM Tris, pH 8, 0,2 M NaCl. ESM-1 est élué  
30                    avec 3 M MgCl<sub>2</sub>. L'éluat est concentré et dialysé dans le tampon 50 mM Tris, pH 8, 0.5 M NaCl et stocké à -70°C.

Des souris Balb/C ont été immunisées par injection de 10 µm de protéine ESM-1 recombinante purifiée par souris, selon un protocole d'immunisation standard en présence d'adjuvant de Freund.

Les cellules d'hybridome sécrétant les anticorps monoclonaux anti-ESM-1 ont été obtenues par fusion, criblage et sous-clonage selon la technique décrite par BECHARD et al. (2000).

Cinq clones cellulaires d'hybridome ont été obtenus et ont été désignés génériquement MEC (« Mouse Monoclonal Antibody to ESM-1 produced by CHO Cells »).

Quatre des hybridomes sélectionnés sont des isotypes IgG1,k respectivement les hybridomes désignés MEC4, MEC5, MEC15 et MEC36.

L'un des hybridomes est l'isotype IgM,k, l'hybridome MEC11.

Les clones cellulaires d'hybridomes ont été cultivés dans du milieu de culture en l'absence de sérum et les anticorps anti-ESM-1 ont été purifiés par chromatographie sur colonne de protéine G-Sépharose commercialisée par la Société Pharmacia (UPSALA, Suède).

**EXEMPLE 4:****Préparation d'un composé antagoniste de la protéine ESM-1 du type polypeptide**

5           La mutagenèse dirigée a été réalisée avec le kit commercialisé par la Société STRATAGENE sous la référence « Site-directed quick mutagenesis kit », qui a été utilisé selon les recommandations du fabricant.

10           Brièvement, un couple d'amorces aller et retour de séquences strictement complémentaires sont synthétisées, ces amorces comprenant les nucléotides codant pour le ou les acides aminés mutés, ou les nucléotides complémentaires, ces nucléotides étant localisés au centre de la séquence des amorces qui comprennent aussi environ 10 à 15 nucléotides consécutifs complémentaires de la séquence à amplifier à la  
15 fois en 5' et en 3' des nucléotides centraux.

          Après amplification par PCR, les polynucléotides amplifiés codant pour la protéine ESM-1 mutée sont insérés dans le vecteur pCDNA3.

          On a utilisé respectivement les couples d'amorces suivants:

20

**a) Pour la protéine ESM-1 F115A**

**Amorce aller** : 5'-GCC TGA AAT TCC CCG CCT TCC AAT ATT CAG-3'  
( SEQ ID N°3).

25

**Amorce retour**: 5'-CTG AAT ATT GGA AGG CGG GGA ATT TCA GGC-  
3'  
( SEQ ID N°4).

30

**b) Pour la protéine ESM-1 F116A**

**Amorce aller** : 5'-CCT GAA ATT CCC CTT CGC CCA ATA TTC AGT  
AAC C-3' (SEQ ID N°5).

**Amorce retour:** 5'-GGT TAC TGA ATA TTG CGC GAA GGG GAA TTT  
CAGT G-3' (SEQ ID N°6).

**c) Pour la protéine ESM-1 F115 F116A**

**Amorce aller:** 5'- CCT GAA ATT CCC CGC CGC CCA ATA TTC AGT  
AAC C-3' (SEQ ID N°7).

**Amorce retour:** 5'- GGT TAC TGA ATA TTG GGC GGC GGG GAA TTT  
CAG G-3' (SEQ ID N°8).

**EXEMPLE 5:Activité pro-tumorigène de la protéine ESM-1  
glycosylée.**

**A. MATERIELS et METHODES**

**A.1. Lignées cellulaires:HEK T. HEK ESM/WT, HEK ESM/S137A, HEK  
ESM/69, HEK ESM/71, HEK ESM/73.**

On a utilisé la lignée cellulaire nommée HEK ESM/WT  
transfectée de façon stable avec l'ADNc codant pour la forme sauvage  
de ESM-1 (ESM/WT). Quatre autres lignées cellulaires sont obtenues  
par transfection avec de l'ADNc codant pour des formes purifiées de  
ESM-1 obtenues par mutagenèse dirigée à partir de la forme sauvage.  
La première d'entre elle, appelée HEK ESM/S137A, exprime la protéine  
ESM-1 mutée, non glycosylée, où une alanine est substituée à la sérine  
137, site majeur de O-glycosylation. Les trois autres lignées exprimant  
une forme glycosylée de ESM-1 dont la partie protéique est mutée. Il  
s'agit des lignées HEK ESM/F115A (remplacement de la phénylalanine  
en position 134, HEK ESM/71 (remplacement de la phénylalanine en  
position 135) et HEK ESM/F115A, F116A (double délétion remplacement  
134-135).

Ainsi, six lignées cellules produisant différentes formes de ESM-  
1 sont utilisées:

- HEK témoin, ne sécrétant pas de ESM-1;



- Forme sauvage de ESM-1: HEK ESM/WT;
- Forme déglycosylée de ESM-1: HEK ESM/S137A;
- Formes glycosylées dont la partie protéique est mutée au niveau de la région 115-116; HEK-ESM/69, HEK-ESM/71, HEK ESM/73.

5

## **A2. Modèle murin de tumeurs xénogéniques**

Les souris utilisées sont de type SCID (Severe Combined IMMUNO Deficiency). Il s'agit plus précisément de souris C.B.17 Scid/scid fournies par l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille. Ces souris présentent une mutation autosomale récessive au niveau de leur système de recombinaison (Blunt., 1995). Cette mutation a pour conséquence la production d'immunoglobulines et de récepteurs de cellules T (TcR) et B 5BcR) non fonctionnels. De ce fait, elles ne possèdent pas de lymphocytes T et B fonctionnels; ces souris tolèrent donc le non-soi et représentent un modèle de choix pour le développement de tumeurs xénogéniques. Les souris SCID utilisées sont des souris mâles et jeunes puisque âgées de 3 à 5 semaines. Pour chacune d'entre-elles, une injection intra-péritonéale d'anticorps anti-ascialo GM-1 (100 µg par souris dilué dans 200 µl de RPMI) est réalisée 24 heures avant l'injection des différentes lignées cellulaires. Il s'agit d'anticorps polyclonaux de lapin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) dirigés spécifiquement contre l'antigène asialo GM-1 exprimé par les cellules NK. Des travaux ont montré que l'utilisation de ces anticorps dans des modèles murins permet de neutraliser l'effet cytotoxique de cellules NK et de favoriser la greffe tumorale (Mather G et al. (1994).

Quatre lots de souris (10 à 15 souris par groupe) anesthésiées à l'éther, sont ensuite injectés, par voie sous-cutanée au niveau du dos. Chaque souris reçoit 1 million de cellules diluées dans 200 µl de RPMI. L'injection de ces cellules définit le premier jour de l'expérience (Jo). Pour chaque souris, une surveillance macroscopique du point d'injection à la recherche de l'apparition d'une éventuelle tumeur ainsi qu'une mesure du poids corporel sont réalisées de façon hebdomadaire. A partir de la 5ème semaine, les souris sont saignées (environ 500 µl par souris), une fois par semaine, afin de doser les taux sériques de ESM-1 par un

test ELISA (BECHARD D et al., 2000). Pour chaque souris, un examen anatomo-pathologique est réalisé.

## B. RESULTATS

5

### **B.1. Induction de tumeurs chez la souris par la protéine ESM-1 glycosylée.**

Des cellules HEK ont été transfectées par un vecteur possédant  
10 un insert contenant l'ADNc codant pour la protéine ESM-1 sauvage glycosylée, désignée ESM/WT. Les cellules HEK sont injectées par voie sous-cutanée à des souris SCID âgées de 5 semaines. Chaque souris reçoit préalablement une injection d'anticorps anti-asialo GN-1 par voie intrapéritonéale.

15 On a analysé le pourcentage de tumeurs ayant un volume supérieur à 1 cm<sup>3</sup> observé chez les souris à la huitième semaine suivant l'injection des cellules HEK transfectées.

Les résultats sont représentés sur la figure 7.

A la figure 7A, on observe que l'injection de cellules HEK  
20 témoins n'induit pas l'apparition de tumeurs chez la souris. En revanche, les cellules HEK transfectées avec un ADN codant pour la protéine ESM-1 glycosylée induisent de nombreuses tumeurs macroscopiquement visibles, dont approximativement 95% d'entre elles ont un volume tumoral supérieur à 1 cm<sup>3</sup>.

25 La figure 7B illustre la cinétique d'apparition des tumeurs chez des souris qui ont reçu les cellules HEK transfectées avec un ADN codant pour la protéine ESM-1 glycosylée. On peut observer que le volume tumoral moyen, exprimé en cm<sup>3</sup>, croît continuellement dès la quatrième semaine suivant l'injection des cellules HEK transfectées.

30 Les résultats expérimentaux présentés à la figure 7 démontrent clairement que la protéine ESM-1 glycosylée a une activité pro-tumorale.

On a également mesuré les taux sériques de protéine ESM-1 chez des souris ayant reçu les cellules HEK témoins et chez les souris ayant reçu les cellules HEK transfectées par l'ADNc codant pour la  
35 protéine ESM-1.

Les résultats sont représentés sur la figure 8.

Les résultats illustrés à la figure 8A montrent que la protéine ESM-1 n'est pas retrouvée dans les sérums des souris ayant reçu les cellules HEK témoins. Au contraire, un taux sérique de 40 à 50 nanogrammes par ml est retrouvé chez les souris ayant reçu les cellules HEK transfectées avec l'ADNc codant pour la protéine ESM-1 à la huitième semaine suivant l'injection des cellules.

On a aussi analysé la cinétique des taux sériques de ESM-1 chez les souris ayant reçu la cellule HEK transfectée exprimant la protéine ESM-1 glycosylée (ESM/WT).

Les résultats sont représentés à la figure 8B.

On peut observer qu'une quantité détectable de protéine ESM-1 est retrouvée dans le sérum des souris dès la cinquième semaine suivant l'injection des cellules et que le taux sérique s'accroît rapidement et continuellement de la cinquième à la douzième semaine suivant l'injection des cellules.

Les résultats expérimentaux illustrés à la figure 8 montrent que les tumeurs qui se sont développées chez les souris ayant reçu les cellules HEK transfectées produisent la protéine ESM-1. De plus, la quantité de protéine ESM-1 produite dans la circulation suit la cinétique de développement des tumeurs chez les souris.

#### **EXEMPLE 6:**

#### **Activité pro-tumorigène de différentes formes de la protéine ESM-1.**

#### **A. MATERIELS ET METHODES**

Les matériels et méthodes utilisés dans cet exemple sont identiques à ceux décrits pour l'exemple 5.

#### **B. RESULTATS**

Les cellules HEK ont été transfectées respectivement par des vecteurs possédant un insert d'ADN codant respectivement pour la forme sauvage de ESM-1 (ESM/WT), une forme non glycosylée de ESM-1

(ESM/S137A) et une forme glycosylée de ESM-1 mutée au niveau des résidus phénylalanine en positions 134 et 135 qui ont été remplacés chacun par un résidu alanine (ESM/73). Les différentes cellules transfectées ont été injectées par voie sous-cutanée à des souris SCID  
5 âgées de 5 semaines et ayant préalablement reçues des anticorps anti-asialo GM-1.

On a analysé le pourcentage de tumeurs macroscopiquement visible ayant un volume tumorale supérieur à 1 cm<sup>3</sup> chez les différents lots de souris. Les résultats sont représentés à la figure 9A.

10 Les résultats de la figure 9A montrent que seule la protéine ESM-1 glycosylée est capable d'induire des tumeurs chez la souris. Ni la protéine ESM-1 non glycosylée, ni la protéine ESM-1 glycosylée mais mutée sur les résidus phénylalanine en positions 134 et 135 ne sont  
capables d'induire le développement de tumeurs chez les souris SCID.

15 On a également analysé le taux sérique de protéine ESM-1 circulante dans les différents lots de souris. Les résultats sont représentés à la figure 9B.

Les résultats de la figure 9B montrent que des taux détectables de protéine ESM-1 sérique ne peuvent être mesurés, à la huitième  
20 semaine suivant l'injection des cellules, que chez les souris ayant reçu les cellules HEK exprimant la protéine ESM-1 glycosylée (ESM/WT).

Ni les souris injectées avec des cellules exprimant la protéine ESM-1 non glycosylée (ESM/S137A), ni les souris ayant reçu les cellules  
25 HEK exprimant la protéine ESM-1 glycosylée et mutée HEK-ESM/F115A, F116A) ne produisent de protéine ESM-1.

L'ensemble des résultats présentés dans cet exemple confirme le pouvoir pro-tumorigène de la protéine ESM-1 glycosylée.

Les résultats montrent aussi que des formes non glycosylées de  
30 la protéine ESM-1 ou encore des formes mutées de la protéine ESM-1 peuvent se comporter comme des antagonistes de cette protéine et posséder un pouvoir préventif et/ou curatif à l'égard de pathologies cancéreuses.

**EXEMPLE 7:****Dosage de la protéine ESM-1 circulante chez des patients atteints de cancers bronchopulmonaires à différents stades de développement.****5 A. Matériels et méthode.**

Le test d'immuno-détection consiste en un test immuno-enzymatique du type « sandwich » dont les caractéristiques générales sont identiques à celui décrit par BECHARD et al. (2000).

10 L'anticorps monoclonal anti-ESM-1 produit par la lignée d'hybridomes MEP14 (CNCM N°I-1942) a été dilué à la concentration de 5µg/ml dans un tampon carbonate 0,1 M, pH 9,5, et adsorbé pendant une nuit à +4°C sur une plaque 96 puits (plaque E.I.A./R.I.A., Costar, Cambridge, MA, USA).

15 La plaque a été saturée pendant une heure à la température du laboratoire avec un volume de 200 µl/puits de tampon PBS contenant 0,1% de sérum albumine bovine et 5mM de EDTA, puis lavée deux fois avec un tampon ELISA (le tampon PBS ci-dessus additionné de 0,1% de Tween 20).

20 Un calibrage a été réalisé avec la protéine ESM-1 purifiée selon la technique décrite par BECHARD et al. (2000).

Les échantillons de sang ont été dilués en série (1:2 à 1:128), dans un tampon ELISA et incubés sur une plaque ELISA pendant une heure à la température du laboratoire.

25 Les puits ont été lavés trois fois avec un tampon ELISA puis incubés pendant 1 heure à la température du laboratoire avec un second anticorps monoclonal dirigé contre ESM-1, l'anticorps MEC15 (CNCM N°I-2572) à la concentration de 0,1µg/ml dans 100 µl de tampon par puits.

30 Après trois lavages, on a ajouté un anticorps monoclonal de rat biotinylé dirigé contre les IgG1 de souris (commercialisé par

PHARMINGEN) dilué dans un tampon ELISA et laissé incuber ce second anticorps pendant une heure .

Après trois lavages dans le tampon ELISA, les puits ont été incubés avec un conjugué de streptavidine-peroxydase à la dilution  
5 1:10.000 v/v (commercialisé par la Société ZYMED).

Après 30 minutes d'incubation avec le conjugué streptavidine-peroxydase, on réalise trois lavages de chaque puits dans un tampon ELISA puis deux lavages dans un tampon PBS.

Le conjugué streptavidine-peroxydase est révélé avec le  
10 substrat TMB commercialisé par la Société SIGMA (Saint-Louis, MO, USA) en présence de 255 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 30'.

La réaction de révélation est stoppée par l'addition d'un volume de 100µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

La plaque est lue à l'aide d'un spectrophotomètre (anthos labtec  
15 LP40, France) à la longueur d'onde de 405 nanomètres.

La concentration de la protéine ESM-1 plasmatique ou sérique est calculée à partir des mesures de densité optique et exprimée en nanogrammes par ml.

## 20 **B. RESULTATS**

On a mesuré la concentration de protéine ESM-1 circulante dans le sérum de différents patients porteurs d'un cancer broncho-pulmonaire à différents stades de développement, respectivement au  
25 stade I, II, IIIA, IIIB et IV selon la classification internationale TNM qui est définie ci-après:

T = taille de la tumeur (T1: < 1 cm; T2: entre 1 et 3 cm; T3:> 3 cm.

N = nodule ganglionnaire (NO si non envahi; N1 si envahi).

30 M = métastase à distance (MO si pas de méastase; M si métastase).

Les patients atteints d'un cancer au stade I présentent une concentration sérique de protéine ESM-1 de 1,43 +/- 0,76 nanogrammes/ml (n = 3).

5 Les patients atteints d'un cancer bronchopulmonaire au stade II présentent une concentration sérique de la protéine ESM-1 de 0,72 +/- 0,39 nanogrammes/ml (n = 3).

Les patients atteints d'un cancer bronchopulmonaire au stade IIIa présentent une concentration de protéine ESM-1 circulante de 0,9 +/- 0,53 nanogrammes/ml (n = 2).

10 Les patients atteints d'un cancer bronchopulmonaire au stade IIIB présentent une concentration de protéine ESM-1 circulante de 3,1 +/- 2,17 nanogrammes/ml (n = 3).

Les patients atteints d'un cancer bronchopulmonaire au stade IV présentent une concentration de protéine ESM-1 circulante de 3,1 +/- 1,91 nanogrammes/ml (n = 11).

15 Les résultats présentés ci-dessus montrent que le taux sérique de protéine ESM-1 augmente en fonction du stade d'évolution du cancer. Une relation claire est donc démontrée entre le niveau de production de la protéine ESM-1 dans la circulation sanguine et la sévérité d'un cancer  
20 chez un patient.

#### **EXEMPLE 8 : Activité anti-tumorale d'un composé antagoniste de ESM-1 du type anticorps.**

##### **A. MATERIEL ET METHODE**

25 Les anticorps monoclonaux MEP-08 sont injectés par voie intrapéritonéale à la dose de 400 µg à partir de la deuxième suivant l'inoculation des cellules HEK/ESM-WT. Les injections sont répétées de façon hebdomadaire pendant 12 semaines. Un anticorps contrôle, MEP-14, est utilisé dans les mêmes conditions. Les souris sont sacrifiées  
30 lorsque leur volume tumoral est supérieur à 6 cm<sup>3</sup>. (n > 8 souris dans

chaque groupe). La figure représente le pourcentage de souris vivantes dans chacun des groupes.

## **B. RESULTATS**

5 Dans la mesure où la phénylalanine en position 115 est indispensable au développement tumoral, elle constitue une nouvelle cible thérapeutique. C'est la raison pour laquelle les anticorps monoclonaux MEP-08 anti-ESM-1, produits par la lignée d'hybridome MEP-08 déposée à la CNCM sous le n°I-1941, dirigés spécifiquement  
10 contre cette région ont été produits et injectés au groupe de souris HEK-ESM/WT. Ils ont pour but d'étudier le rôle du peptide de ESM-1 dans le développement tumoral et d'évaluer un éventuel effet thérapeutique. Afin d'éliminer un effet anti-tumoral dépendant du fragment Fc de l'anticorps (réaction d'ADCC), un anticorps contrôle de même isotype mais  
15 reconnaissant un épitope différent a été utilisé parallèlement et dans les mêmes conditions.

La figure 10 montre que les injections précoces d'anticorps MEP-08 augmentent la survie des souris de façon significative de près de 60% alors que les anticorps MEP-14 n'ont pas d'effet. Ces premiers  
20 résultats montrent qu'il s'agit d'une action spécifique liée au fragment Fab de l'anticorps dirigé spécifiquement contre la phénylalanine en position 115 et confirment l'implication du peptide dans la croissance tumorale. Il est surprenant de constater que cet effet sur la survie diminue lorsque les anticorps sont administrés de façon retardée.

25 Quelle que soit la semaine où débutent les injections, les anticorps peuvent retarder ou empêcher la croissance tumorale. Cet effet anti-tumoral reste plus prononcé lorsque les anticorps sont utilisés précocement.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- 5 • ANFOSSI et al. (1989), Acad. Sci., vol.86: 3379-3383
- AUSUBEL F. et al.K, 1989, Current Protocols in Molecular Biology  
GREEN publishing Associates and WHILEY Interscience, N.Y.
- BECHARD et al. 2000, J. Vasc. Res. 37(5): 417-425.
- BEAUCAGE et al., 1981, Tetrahedron Lett., vol.22: 1859-1862
- 10 • BLUNT (1995) [Référence à compléter S.V.P.].
- BROWN EL, BELAGAJE R, RYAN MJ, KHORANA HG, Methods  
ENZYMOLOGY, 1979, Vol. 68: 109-151
- BUSH et al., 1997, J. Chromatogr. , vol.777: 311-328
- CELLA G et al., 1992, Angiology, vol.43
- 15 • DELORME MA et al., (1996, Thromb Haemost, vol.75:747-751.)
- EDWARDS and LEATHERBARROW, 1997, Analytical  
Biochemistry, vol. 246: 1 - 6 .
- FELICI F, 1991, J. Mol. Biol., vol. 222:301-310
- GAO et al, 1996, J. Biol. Chem, vol. 271 (15):9002-9008
- 20 • GLUZMAN , 1982, Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor  
Laboratory.
- GREEN et al., 1986, Ann. Rev. Biochem., vol.55: 569-597
- HOLT et al, 1988, Mol. Cell Biol. vol.8 : 963-973
- HOUBEN WEYL, 1974, in Meuthode der Organischen Chemie,  
25 E.WUNSCH ed, vols.15-I et 15-2
- IZANT JG, WEINTRAUB H, 1984, Cell, vol.36 (4): 1007-1015
- KOHLER G. and MIELSTEIN C. , 1975, Nat. Vol.256:495.
- KOZBOR et al. (1983), Hybridoma, vol.2 (1): 7-16
- LASSALLE P et al. , 1996, The Journal of Biological Chemistry,  
30 vol.271(34): 20.458-20.464.
- LASSALLE P et al., 1992, Eur. J. Immunol., vol.22:425-431
- LEGER et al. (1997), Hum. antibodies, vol.8 (1): 3-16.
- LUCAS AH, 1994, In: Development and Clinical uses of  
haemophilus b Conjugate
- 35 • MATHER G et al. 1994, Immunobiology, 190 (4-5): 333-345.

- MARTINEAU P, JONES P., WINTER G et al., 1998, J. Mol. Biol, vol.280(1): 117-127.
- MERRIFIELD RB, 1965a, Nat., vol.207(996): 522-523
- MERRIFIELD RB 1965b Science, vol.150(693):178-185)
- 5 • MOXHAM et al., 1993, Science, vol.2602: 991-995.
- NARANG SA, HSIUNG HN, BROUSSEAU R, et al. 1979, Methods enzymol, vol.68 ,90-98
- NATALI PG et al. , 1996, Int. J. Cancer, vol.69:212-217
- LEE and NATHANS, 1988, J. Biol. Chem., vol.263: 3521
- 10 • OLDENBURG KR et al., 1992, Proc Natl. Acad. Sci, vol. 89: 5393-5397
- RAHIMI N et al. (1998), J. Biol. Chem., vol.273:33.714-33.721
- RIDDER R, SCHMITZ R, LEGAY F, GRAM H, 1995, Biotechnology (N.Y.), vol.13 (3): 255-260.
- 15 • SIEGFRIED JM et al., 1998, Ann. Thorac. Surg.,vol.66: 1915-1918
- OTSUKA T et al., 1998, Cancer Res., vol.58:5157-5167
- PARMLEY and SMITH, 1988, Gene, vol.73: 305-318
- REINMANN KA et al., 1997, AIDS Res. Hum. Retroviruses, vol.13 (11):933-943
- 20 • ROSSI et al., 1991, Pharmacol. Ther, vol.50 : 245-254
- SALE et al, 1995, EMBO J. vol.14 (4): 674-684
- SCZAKIEL G et al. , 1995, Trends Microbiol, vol.3 (6): 213-217
- TAKAYAMA H ET Al, 1997, Lab. Invest. vol.77: 131-138
- VALADON P et al. , 1996, J. Mol. Biol., vol. 261: 11-22
- 25 • WANG et al., 1997, Chromatographia, vol.44 : 205-208
- WESTERING MAJ, 1995, Proc. Natl. acad. sci, vol.92: 4021-4025
- WICKSTROM et al, 1988, Proc. Natl. Acad. sci. vol.85: 1028-1032
- WEIDNER KM et al., 1993, J. Cell Biol. vol. 121: 145-154

## **REVENDEICATIONS**

1. Utilisation d'un composé antagoniste de la protéine ESM-1 pour la fabrication d'un médicament pour le traitement d'un cancer.

5        2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé antagoniste de la protéine ESM-1 consiste en un anticorps se liant spécifiquement à la protéine ESM-1.

3. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que le composé antagoniste du type anticorps se lie spécifiquement à l'un des  
10 déterminants antigéniques AgD1, AgD2 ou AgD3 de la protéine ESM-1.

4. Utilisation selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisée en ce que le composé antagoniste du type anticorps est choisi parmi les anticorps monoclonaux sécrétés par les lignées d'hybridome suivantes:

- l'hybridome MEP21 déposé le 19 Novembre 1997 auprès de la  
15 Collection Nationale de Cultures des Micro-organismes de l'Institut Pasteur (CNCM) sous le n° d'accès I-1944;

- l'hybridome MEP14 déposé le 19 Novembre 1997 auprès de la CNCM sous le n° d'accès n°I-1942;

- l'hybridome MEP19 déposé le 19 Novembre 1997 auprès de la  
20 CNCM sous le n° d'accès n°I-1943;

- l'hybridome MEP08 déposé le 19 Novembre 1997 auprès de la CNCM sous le N° d'accès n° I-1941.

5. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que le composé antagoniste du type anticorps est l'anticorps produit par la  
25 lignée d'hybridome MEC15 déposée le 17 Octobre 2000 auprès de la CNCM sous le n° d'accès n°I-2572.

6. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé antagoniste de la protéine ESM-1 est un polypeptide ayant une longueur d'au moins 10 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ  
30 ID n°1 et comprenant la séquence d'acides aminés allant de l'acide aminé en position 119 jusqu'à l'acide aminé en position 139 de la séquence SEQ ID n°1 et comprenant au moins une substitution d'un acide aminé, par rapport à la séquence correspondante de la séquence SEQ ID N°1.

7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le composé antagoniste de la protéine ESM-1 comprend une ou plusieurs substitutions d'un acide aminé contenant un cycle aromatique retrouvé dans la séquence SEQ ID n°1 par un acide aminé ne contenant pas de cycle aromatique.

8. Utilisation selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce que le composé antagoniste de la protéine ESM-1 comprend, par rapport à la séquence SEQ ID N°1, une substitution des résidus phénylalanine en positions 134 et 135 de la séquence SEQ ID N°1 par deux résidus d'acides aminés, identiques ou différents, ne contenant pas de cycle aromatique.

9. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé antagoniste de la protéine ESM-1 consiste en un oligonucléotide antisens.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que le composé antagoniste de la protéine ESM-1 du type oligonucléotide antisens consiste en un polynucléotide comprenant au moins 20 nucléotides consécutifs de l'ADNc de ESM-1 de séquence SEQ ID N°2.

11. Composé antagoniste de la protéine ESM-1, caractérisé en ce qu'il consiste en l'anticorps monoclonal produit par la lignée d'hybridome MEC15 déposée auprès de la CNCM le 17 Octobre 2000 sous le n° d'accès n°I-2572.

12. Procédé de sélection d'un composé antagoniste de la protéine ESM-1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) injecter à un animal des cellules capables de former des tumeurs en présence de la protéine ESM-1, lesdites cellules étant transfectées ou transformées par un acide nucléique capable d'exprimer la protéine ESM-1 *in vivo*;

b) administrer à cet animal un composé candidat antagoniste de la protéine ESM-1;

c) comparer la formation de tumeurs chez un premier animal tel qu'obtenu à la fin de l'étape b) et chez un second animal tel qu'obtenu à la fin de l'étape a); et

d) sélectionner le composé candidat capable d'inhiber ou de bloquer la formation de tumeurs chez le premier animal.

13. Procédé de sélection d'un composé candidat antagoniste de la protéine ESM-1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- 5 a) fournir un polypeptide consistant en la protéine ESM-1 ou un fragment peptidique de cette protéine;
- b) mettre en contact ledit polypeptide avec le composé candidat à tester;
- c) détecter les complexes formés entre ledit polypeptide et le composé candidat;
- 10 d) sélectionner les composés candidats se fixant sur le polypeptide constitué de la protéine ESM-1 ou d'un fragment de cette protéine.

14. Procédé de sélection d'un composé antagoniste de la protéine ESM-1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- 15 a) mettre en contact la protéine ESM-1 ou un fragment peptidique de cette dernière en présence de :
  - (i) un composé antagoniste de la protéine ESM-1 se fixant sur la protéine ESM-1; et
  - (ii) un composé candidat à tester;
- 20 b) dans une étape séparée de l'étape a), mais éventuellement simultanée à cette dernière, mettre en contact la protéine ESM-1 ou un fragment peptidique de cette dernière avec un composé antagoniste de la protéine ESM-1 se fixant sur la protéine ESM-1;
- c) détecter la quantité respective du composé antagoniste de la protéine ESM-1 fixée à l'issue de chacune des étapes a) et b); et
- 25 d) sélectionner le composé candidat qui entre en compétition avec le composé antagoniste pour la fixation sur la protéine ESM-1.

15. Procédé pour sélectionner un composé antagoniste de la protéine ESM-1 à partir d'un composé candidat, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- 30 a) sélectionner, parmi les composés candidats, les composés qui se fixent sur la protéine ESM-1 ou sur un fragment peptidique de cette protéine;

b) administrer un composé sélectionné à l'étape a) à un animal et déterminer la capacité de ce composé à inhiber, chez cet animal, le développement de tumeurs induites par la protéine ESM-1;

c) sélectionner les composés inhibiteurs du développement des tumeurs déterminés à l'étape b) comme des composés antagonistes de la protéine ESM-1.

16. Composition pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention d'un cancer comprenant un composé antagoniste de la protéine ESM-1.

10 17. Composition pharmaceutique selon la revendication 16, caractérisée en ce que le composé antagoniste de la protéine ESM-1 est un anticorps se liant spécifiquement à la protéine ESM-1.

18. Composition pharmaceutique selon la revendication 17, caractérisée en ce que le composé antagoniste de la protéine ESM-1 est l'anticorps produit par la lignée d'hybridome MEP08 déposée auprès de la CNCM le 19 Novembre 1997 sous le n° d'accès I-1941 ou l'anticorps produit par la lignée d'hybridome MEC15 déposée auprès de la CNCM le 17 Octobre 2000 sous le N° d'accès I-2572.

19. Composition pharmaceutique selon la revendication 16, caractérisée en ce que le composé antagoniste de la protéine ESM-1 est un polypeptide comprenant au moins 10 acides aminés consécutifs de la protéine ESM-1 de séquence SEQ ID N°1, comprenant une séquence d'acides aminés allant de l'acide aminé en position 119 jusqu'à l'acide aminé en position 139 de la séquence SEQ ID N°1 et comprenant au moins, par rapport à la séquence SEQ ID N°1, une substitution d'un acide aminé.

20. Composition pharmaceutique selon la revendication 16, caractérisée en ce que le composé antagoniste de la protéine ESM-1 consiste en un polynucléotide antisens.

1/10

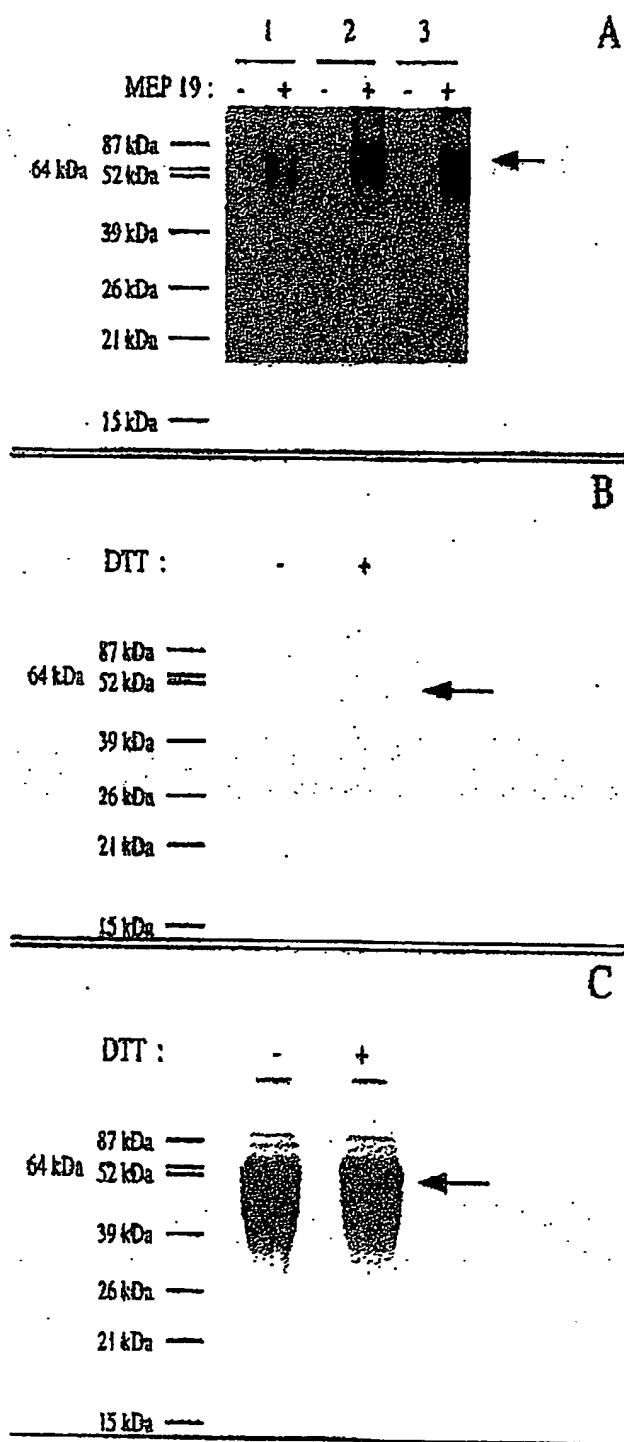


Figure 1

2/10

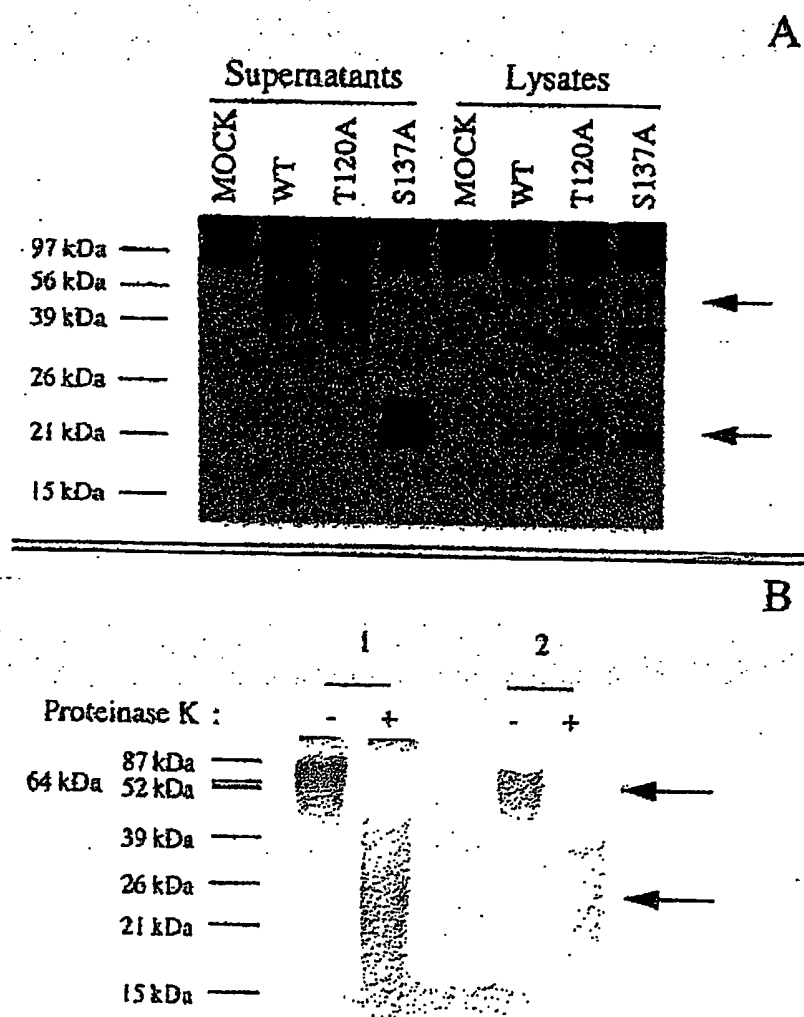


Figure 2



3/10

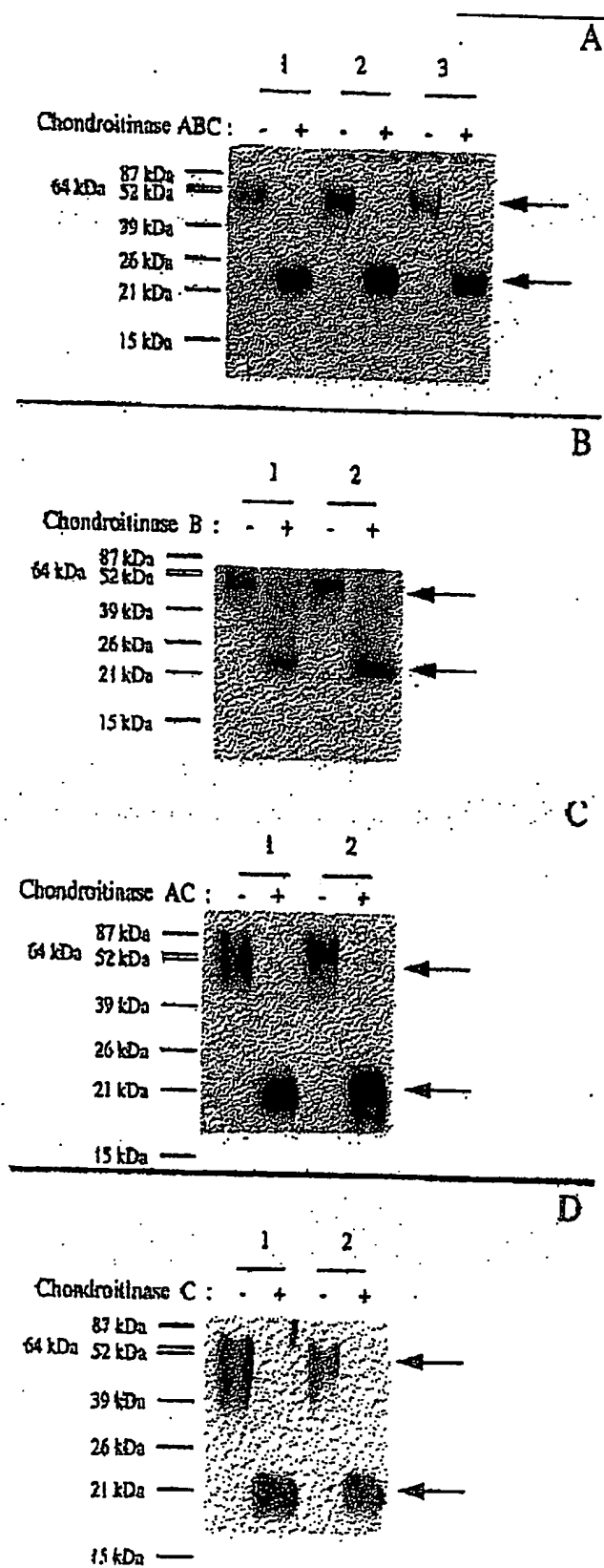


Figure 3

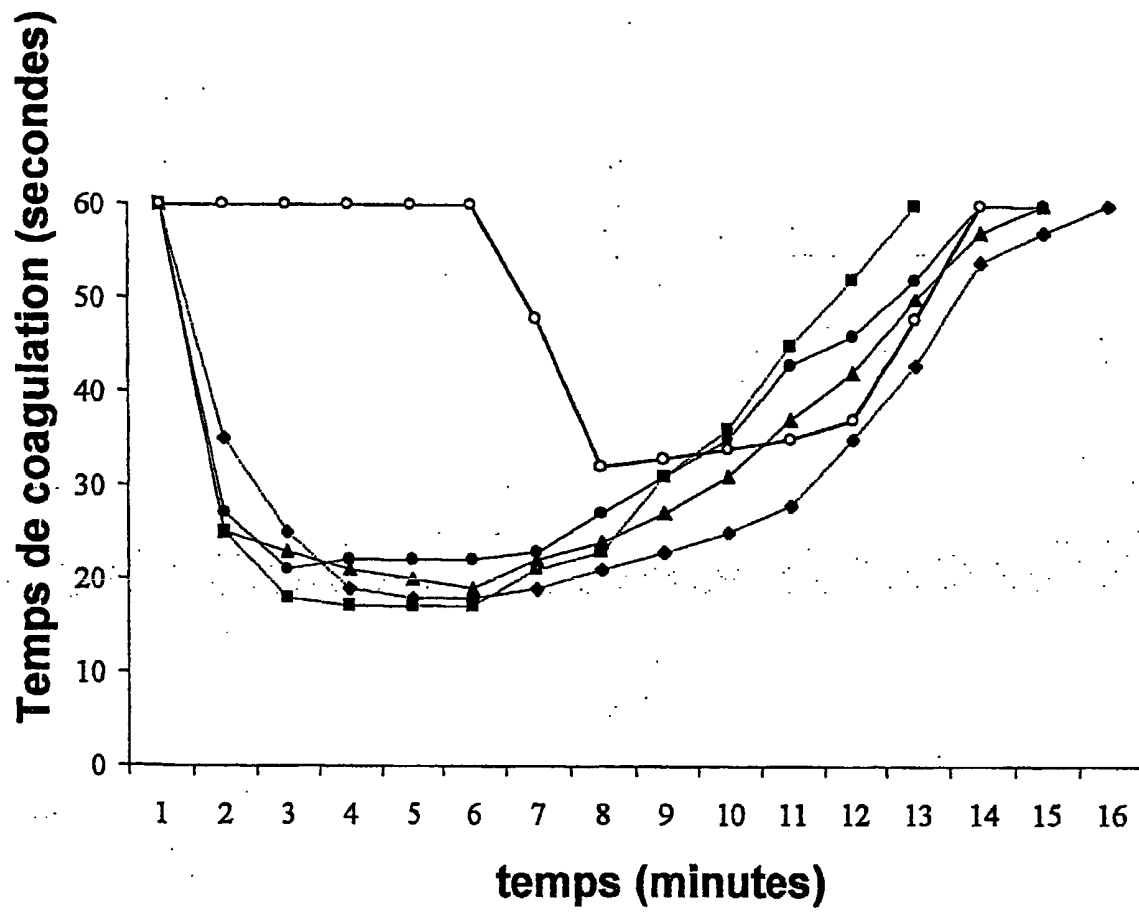


Figure 4

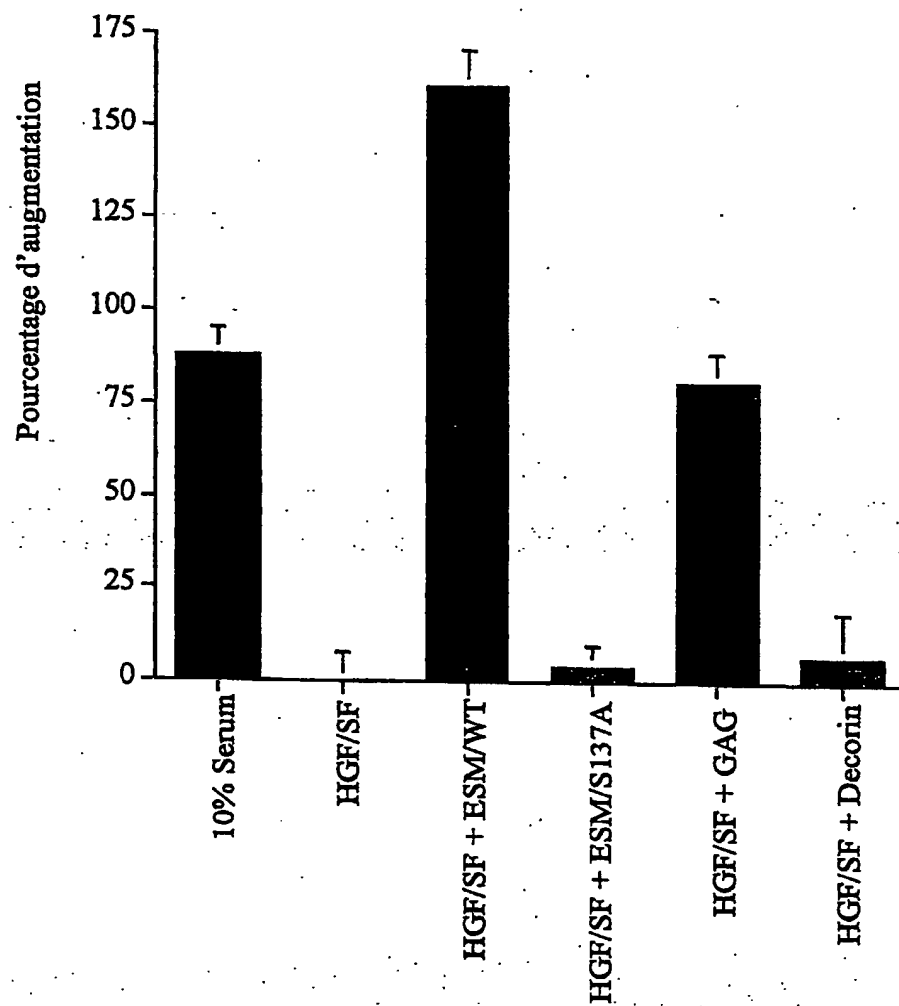


Figure 5

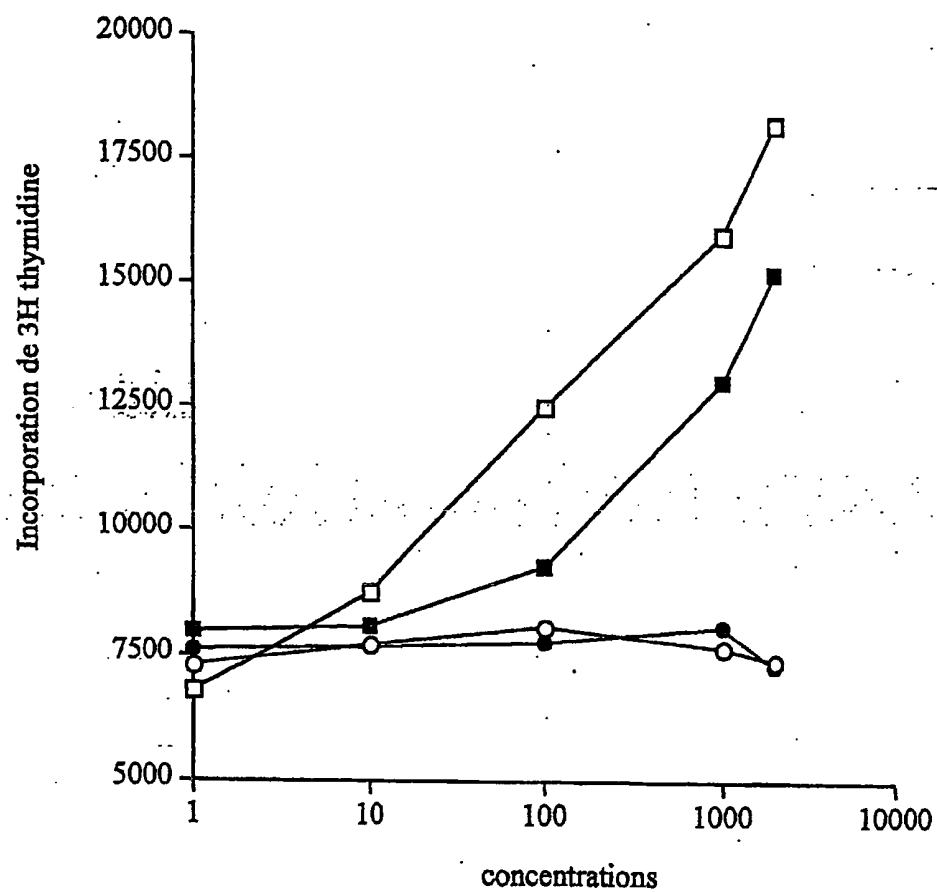


Figure 6

7/10

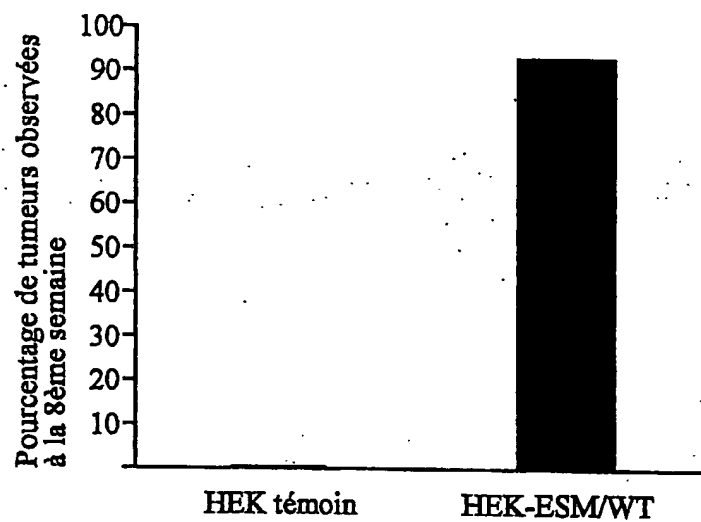


Figure 7A

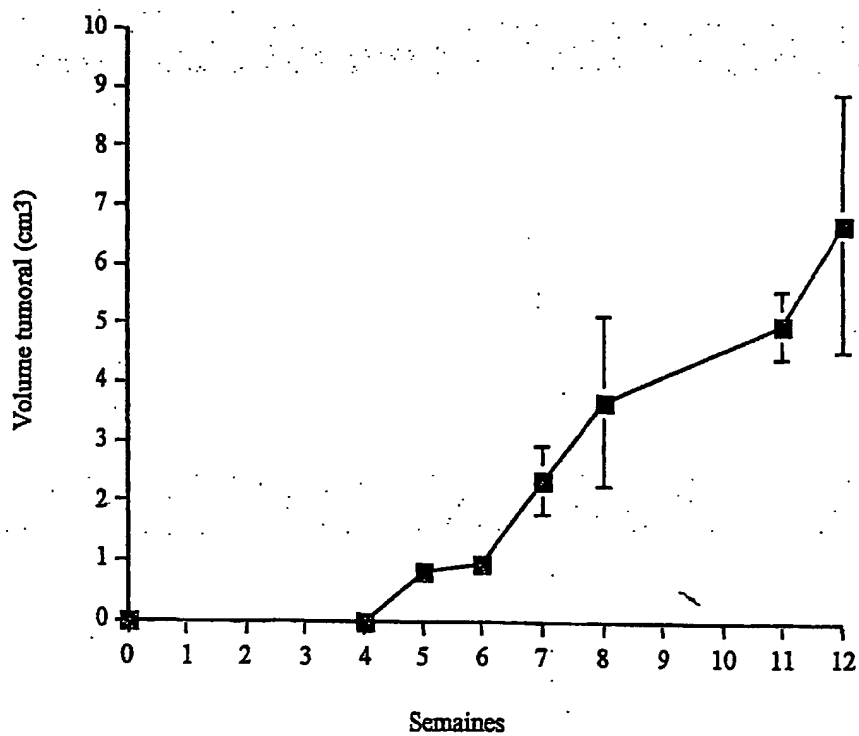


Figure 7B

8/10

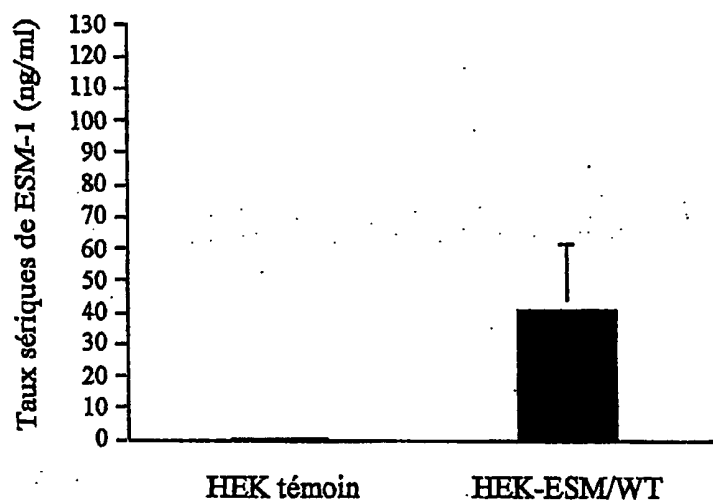


Figure 8A

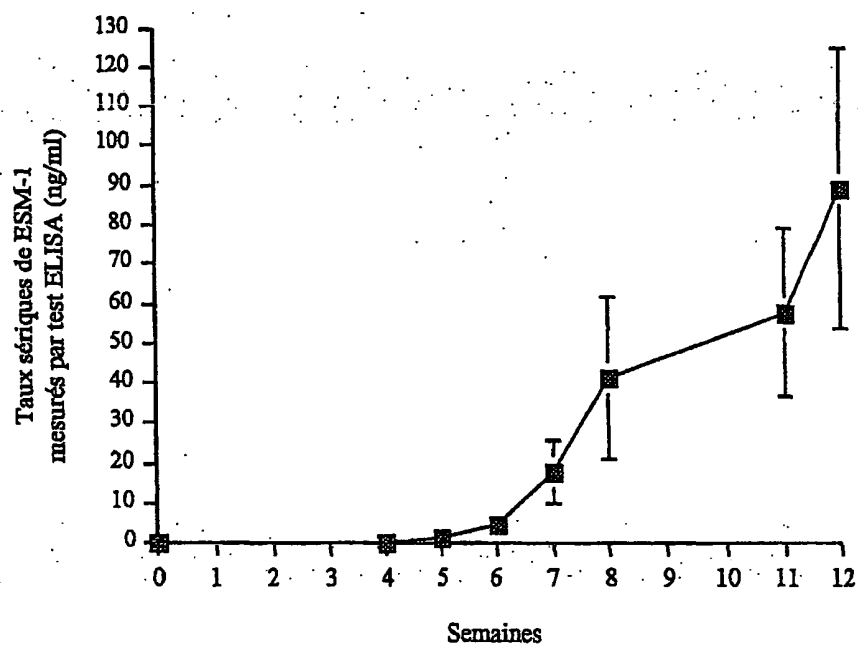


Figure 8B

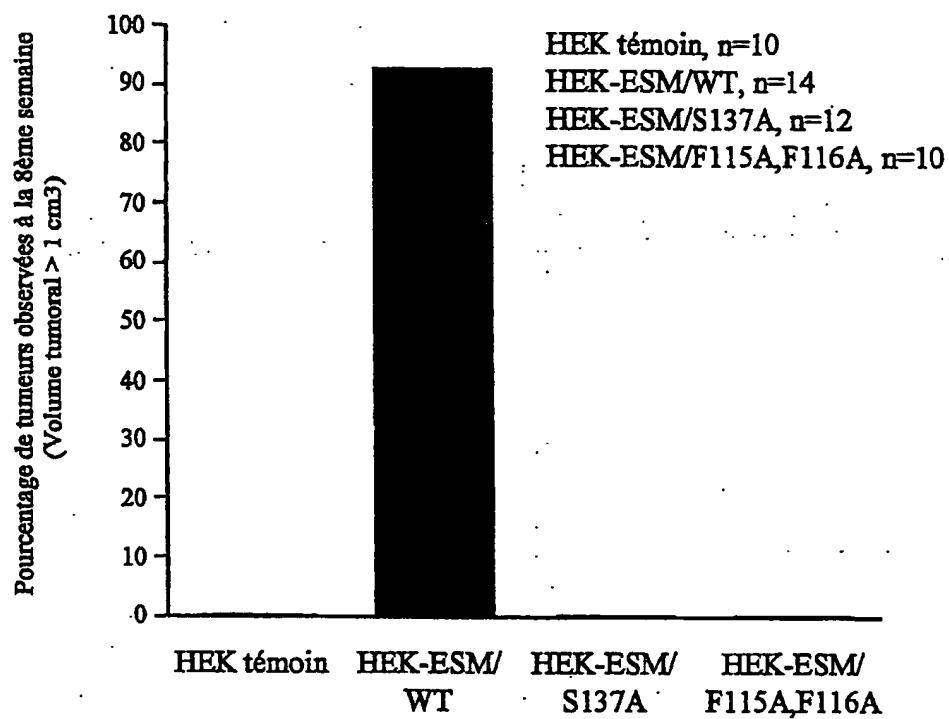


Figure 9A

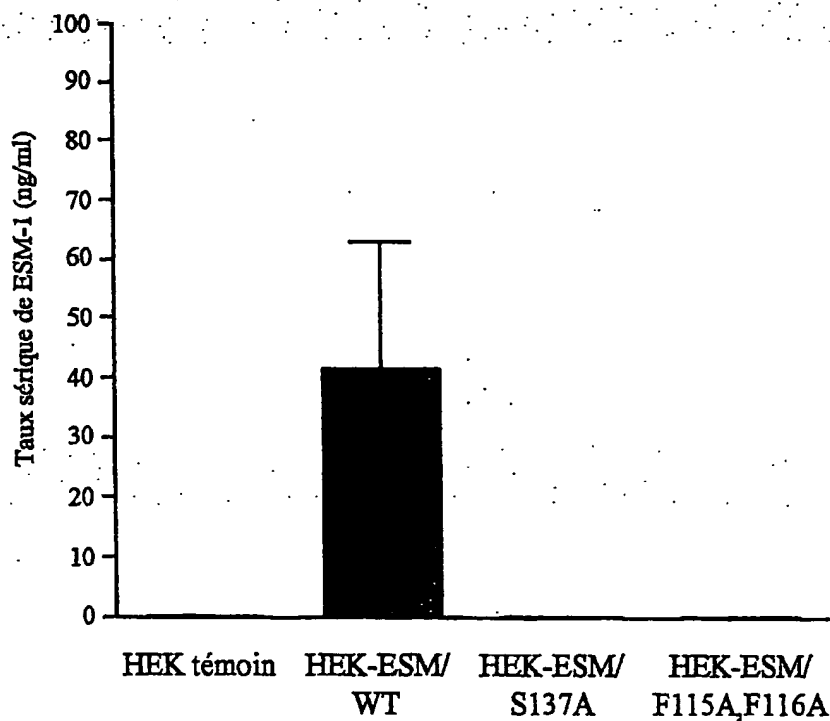


Figure 9B

10/10

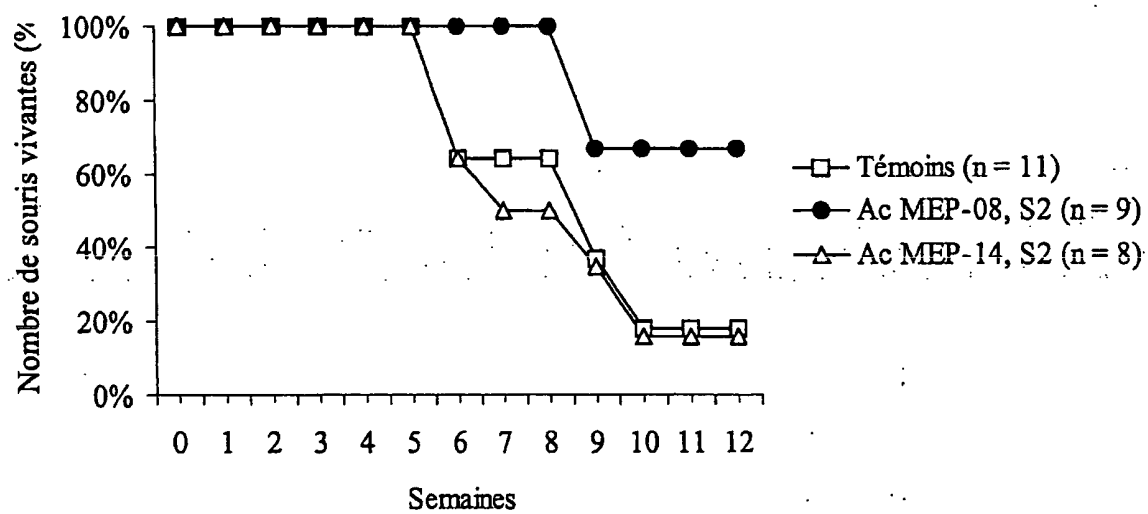


FIGURE 10



## LISTE DE SEQUENCES

<110> Institut Pasteur de Lille  
Institut National de la Santé et de la Recherche M

<120> Utilisation d'un composé antagoniste de la protéine  
ESM-1 pour la fabrication d'un médicament pour la  
prévention et/ou le traitement d'un cancer.

<130> IP Lille ESM-1 et cancer

<140>  
<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 184  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Lys	Ser	Val	Leu	Leu	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Val	Pro	Ala	His	Leu
1				5					10					15	
Val	Ala	Ala	Trp	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp	Cys	Pro	Gln	His	Cys
			20					25					30		
Asp	Ser	Ser	Glu	Cys	Lys	Ser	Ser	Pro	Arg	Cys	Lys	Arg	Thr	Val	Leu
			35				40					45			
Asp	Asp	Cys	Gly	Cys	Cys	Arg	Val	Cys	Ala	Ala	Gly	Arg	Gly	Glu	Thr
	50					55					60				
Cys	Tyr	Arg	Thr	Val	Ser	Gly	Met	Asp	Gly	Met	Lys	Cys	Gly	Pro	Gly
65					70				75					80	
Leu	Arg	Cys	Gln	Pro	Ser	Asn	Gly	Glu	Asp	Pro	Phe	Gly	Glu	Glu	Phe
			85					90					95		
Gly	Ile	Cys	Lys	Asp	Cys	Pro	Tyr	Gly	Thr	Phe	Gly	Met	Asp	Cys	Arg
		100						105					110		
Glu	Thr	Cys	Asn	Cys	Gln	Ser	Gly	Ile	Cys	Asp	Arg	Gly	Thr	Gly	Lys
		115					120					125			
Cys	Leu	Lys	Phe	Pro	Phe	Phe	Gln	Tyr	Ser	Val	Thr	Lys	Ser	Ser	Asn
	130						135				140				
Arg	Phe	Val	Ser	Leu	Thr	Glu	His	Asp	Met	Ala	Ser	Gly	Asp	Gly	Asn
145					150					155					160

2

Ile Val Arg Glu Glu Val Val Lys Glu Asn Ala Ala Gly Ser Pro Val  
 165 170 175

Met Arg Lys Trp Leu Asn Pro Arg  
 180

<210> 2  
 <211> 2006  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 cttcccacca gcaaagacca cgactggaga gccgagccgg aggcagctgg gaaacatgaa 60  
 gagcgtcttg ctgctgacca cgctcctcgt gcctgcacac ctggtggccg cctggagcaa 120  
 taattatgcg gtggactgcc ctcaacactg tgacagcagt gaggcgcaaaa gcagcccgcg 180  
 ctgcaagagg acagtgtcgc acgactgtgg ctgctgccga gtgtgcgctg cagggcgggg 240  
 agaaacttgc taccgcacag tctcaggcat ggatggcatg aagtgtggcc cggggctgag 300  
 gtgtcagcct tctaattgggg aggatccttt tggatgaagag tttggtatct gcaaagactg 360  
 tccctacggc accttcggga tggattgcag agagacctgc aactgccagt caggcatctg 420  
 tgacaggggg acgggaaaat gcctgaaatt ccccttcttc caatattcag taaccaagtc 480  
 ttccaacaga tttgtttctc tcacggagca tgacatggca tctggagatg gcaatattgt 540  
 gagagaagaa gttgtgaaag agaattgtgc cgggtctccc gtaattgagga aatgggttaa 600  
 tccacgctga tcccggtgtg gatttctgag agaaggctct attttcgtga ttgttcaaca 660  
 cacagccaac attttaggaa ctttctagat atagcataag tacatgtaat ttttgaagat 720  
 ccaaattgtg atgcatggtg gatccagaaa acaaaaagta ggatacttac aatccataac 780  
 atccatatga ctgaacactt gtatgtgttt gttaaatatt cgaatgcatg tagatttgtt 840  
 aaatgtgtgt gtatagtaac actgaagaac taaaaatgca atttaggtaa tcttacatgg 900  
 agacaggtca accaaagagg gagctaggca aagctgaaga ccgcagttag tcaaattagt 960  
 tctttgactt tgatgtacat taatgttggg atatggaatg aagacttaag agcaggagaa 1020  
 gatggggagg ggggtggagt gggaaataaa atatttagcc ctctcttggg aggtagcttc 1080  
 tctagaattt aattgtgctt tttttttttt tttggctttg ggaaaagtca aaataaaaaca 1140  
 accagaaaac ccctgaagga agtaagatgt ttgaagctta tggaaatttg agtaacaaac 1200  
 agctttgaac tgagagcaat ttcaaaaggc tgctgatgta gttcccgggt tacctgtatc 1260  
 tgaaggacgg ttctggggca taggaaacac atacacttcc ataaatagct ttaacgtatg 1320  
 ccacctcaga gataaatcta agaagtattt taccactgg tggtttgtgt gtgtatgaag 1380  
 gtaaataattt atataatttt ataaataaat gtgttagtgc aagtcattct ccctacccat 1440  
 atttatcatc ctcttgagga aagaaatcta gtattatttg ttgaaaatgg ttagaataaa 1500  
 aacctatgac tctataaggt tttcaaacat ctgaggcatg ataaatttat tatccataat 1560  
 tataggagtc actctggatt tcaaaaaatg tcaaaaaatg agcaacagag ggaccttatt 1620  
 taaacataag tgctgtgact tcgggtgaatt ttcaatttaa ggtatgaaaa taagttttta 1680  
 ggaggtttgt aaaagaagaa tcaattttca gcagaaaaca tgtcaacttt aaaatatagg 1740  
 tggaattagg agtatatttg aaagaatctt agcacaaaaca ggactgttgt actagatggt 1800  
 cttaggaaat atctcagaag tatttttattt gaagtgaaga acttatttaa gaattatttc 1860  
 agtatttacc tgtattttat tcttgaagtt ggccaacaga gttgtgaatg tgtgtggaag 1920  
 gcctttgaat gtaaagctgc ataagctgtt aggttttgtt ttaaaaggac atgtttatta 1980  
 ttgttcaata aaaaagaaca agatac 2006

<210> 3  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 3

gcctgaaatt cccgccttc caatattcag

30

<210> 4

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 4

ctgaatattg gaaggcggg aatttcaggc

30

<210> 5

<211> 34

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 5

cctgaaattc cccttcgccc aatattcagt aacc

34

<210> 6

<211> 34

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 6

ggttactgaa tattgggcga aggggaattt cagg

34

<210> 7

<211> 34

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<400> 7

cctgaaattc cccgccgccc aatattcagt aacc

34

<210> 8

<211> 34

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 8

ggttactgaa tattgggcgg cggggaattt cagg 34

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**